

Université de Montréal

*Complémentation fonctionnelle in vivo des phénotypes
observés chez la souris grey-lethal (gl)*

par

Monica Pata

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Science (M.Sc.)

en Biologie Moléculaire

Août, 2004

©, Monica Pata, 2004



QH

506

U54

2005

V.016

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
*Complémentation fonctionnelle in vivo des phénotypes
observés chez la souris grey-lethal (gl)*

Présenté par :

Monica Pata

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Martine Raymond

président-rapporteur

Dr. Jean Vacher

directeur de recherche

Dr. Nicole Beauchemin

examineur externe

RÉSUMÉ

Le maintien de la masse osseuse repose sur l'équilibre qui existe entre la formation et la résorption du tissu osseux. Les ostéoblastes, cellules dérivées de précurseurs du mésenchyme, sont responsables de la formation de la matrice osseuse, alors que les ostéoclastes, cellules d'origine hématopoïétique, assurent la résorption de cette matrice. L'ostéopétrose est une pathologie osseuse rare qui se caractérise par une accumulation anormale de tissus osseux et un faible développement de la moelle osseuse.

La souris grey-lethal (*gl*) représente le modèle animal idéal pour l'étude de l'ostéopétrose récessive maligne. Cette mutation se traduit chez la souris par l'absence de la cavité médullaire (ostéopétrose) et par une coloration grise du pelage. Le gène *gl* a récemment été identifié par une approche de clonage positionnel. La mutation qui affecte le gène a été identifiée et consiste en une délétion qui abolit l'expression du gène chez la souris homozygote mutante. Une approche de complémentation fonctionnelle *in vivo* dans des souris transgéniques BAC a permis de démontrer le rétablissement des deux phénotypes majeurs (ostéopétrose et coloration du pelage). Les travaux de notre laboratoire ont démontré que la protéine Gl est essentielle à la fonction et à la maturation des ostéoclastes, mais également des mélanocytes. De plus, nous avons isolé la première mutation chez l'humain démontrant l'importance du gène *gl* dans la biologie de l'ostéoclaste.

Ce mémoire porte sur l'établissement du rôle *in vivo* du gène grey-lethal (*gl*) dans la maladie ostéopétrotique ainsi que dans le déficit de la coloration du poil par une approche de complémentation fonctionnelle ciblée dans les souris transgéniques.

L'ADNc pleine longueur du gène *gl* a été cloné sous le contrôle de deux promoteurs spécifiques : pTRAP (*tartrate resistant acid phosphatase*) afin de cibler son expression aux ostéoclastes et pTYR (*tyrosinase*) afin de cibler son expression aux mélanocytes. Plusieurs souris fondatrices ont été générées et des

lignées transgéniques établies (au nombre de 4 TRAP-gl et 4 TYR-gl). La caractérisation des lignées TYR-gl a permis de démontrer que les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques bien qu'ostéopérotiques présentent une restauration de la coloration *agouti* du pelage. De plus, une dilution de la coloration du pelage a été observée chez les souris surexprimant le transgène TRAP-gl. Par contre, la complémentation du phénotype ostéopérotique n'a pas été observée chez les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques TRAP-gl.

En résumé, mes études ont permis de démontrer *in vivo* que l'activité du gène *gl* est indispensable aux mécanismes moléculaires requis pour la synthèse et à la distribution des protéines pigmentaires au niveau du poil. Par contre, son rôle dans l'homéostasie osseuse semble plus complexe. En effet, de récents résultats démontrent que l'activité du gène *gl* est essentielle au maintien de l'homéostasie osseuse en régulant l'activité des ostéoclastes, mais ce très tôt durant le développement.

Mots clés : Ostéopétrose, ostéoclastes, grey-lethal, mélanocytes, transgénèse, complémentation fonctionnelle, TRAP, TYR

SUMMARY

Regulation of bone mass relies on a strict equilibrium between bone formation and bone resorption. The osteoblasts, a cell type derived from mesenchymal precursors, are responsible for the formation of bone matrix; in contrast the osteoclasts, derived from hematopoietic precursors, ensure the resorption of that same bone matrix. Osteopetrosis is a rare bone disease characterized by an abnormal bone mass that leads to an absence of bone marrow development.

Grey-lethal (*gl*) mouse is an established and relevant animal model of recessive osteopetrosis, its phenotype resembling the human infantile disease. This mutant displays two major phenotypes: a severe osteopetrosis and a coat color dilution as homozygote *gl/gl* mice are grey instead of agouti. The *gl* gene has recently been identified by a positional cloning approach. The mutation corresponds to a deletion of the regulatory region on the *gl* gene that completely abolishes the expression of the gene in the homozygous state. In vivo functional rescue of osteopetrosis and of coat color obtained in transgenic BAC mice further confirmed the identity of the *gl* gene. We have recently identified the first human mutation on the *gl* gene reinforcing the importance of the *gl* gene in the osteoclasts function and bone biology.

This work assesses the in vivo role of the grey-lethal (*gl*) gene in the osteopetrotic disease as in the coat color phenotype by a targeted functional rescue approach in transgenic mice.

Full length cDNA of the *gl* gene was cloned under the control of two specific promoters: pTRAP (tartrate resistant acid phosphatase) targets the expression specifically to the osteoclasts and pTYR (tyrosinase) targets the expression specifically to the melanocytes. Founder mice were generated and transgenic lines established for each transgene (4 TRAP-*gl* and 4 TYR-*gl*). Characterization of TYR transgenic homozygous *gl/gl* mice showed a complete restoration of the agouti coat color although these mice remained osteopetrotic as expected.

Moreover, additional diluting of the coat color phenotype was observed in mice overexpressing the transgene TYR-*gl*. In contrast, rescue of the osteopetrotic phenotype was not demonstrated in the homozygous *gl/gl* TRAP-*gl* transgenic mice.

In summary, my studies demonstrate that the activity of the *gl* gene is essential for the maintenance of molecular mechanisms required for proper synthesis/distribution of pigmented proteins in the hair. On the other hand, its role in bone homeostasis seems more complex. Recent results show that the activity of the *gl* gene is essential for the maintenance of bone homeostasis by controlling osteoclast activity at a very early step during development.

Key words: Osteopetrosis, osteoclasts, grey-lethal, melanocytes, transgene, functional rescue, TRAP, TYR.

TABLE DES MATIÈRES

TITRE DU MÉMOIRE	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
DÉDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	 1
1. Le tissu osseux et l'homéostasie osseuse	2
1.1 Le tissu osseux	2
1.2 Homéostasie osseuse	4
1.2 Désordre de l'homéostasie osseuse	6
2. Ostéoblastes et ostéoclastes	9
2.1 L'ostéoblaste et la formation osseuse	9
2.1.1 Origine et différenciation de l'ostéoblaste	9
2.1.2 Fonction de l'ostéoblaste	12
2.1.3 Régulation de l'ostéoblaste	13
2.2 L'ostéoclaste et la résorption osseuse	14
2.2.1 Origine et différenciation de l'ostéoclaste	15
2.2.2 Fonction de l'ostéoclaste	21
2.2.2.1 Migration et attachement de l'ostéoclaste	22
2.2.2.2 Dissolution et dégradation de la matrice osseuse	24
2.2.3 Contrôle de la résorption	26

3. Désordres squelettiques et modèles animaux	29
3.1 Modèles animaux de l'ostéopétrose	29
3.1.1 Mutants spontanés chez la souris	29
3.1.2 Mutants induits chez la souris	32
4. La peau et la pigmentation	37
4.1 Mélanocytes et synthèse des pigments	40
4.1.1 Origine et différenciation des mélanocytes	40
4.1.2 Fonction des mélanocytes	44
4.1.3 Contrôle de la pigmentation	48
5. Phénotype ostéopérotique et défaut de coloration chez la souris	51
6. La souris <i>grey-lethal</i>	53
6.1 Phénotype de la souris <i>gl</i>	53
6.1.1 Phénotype squelettique	54
6.1.2 Phénotype de couleur du pelage	55
6.2 Caractérisation de la souris <i>gl</i>	55
6.2.1 Les ostéoclastes	57
6.2.2 Les mélanocytes	60
6.3 Caractérisation génétique de la souris <i>gl</i>	61
6.3.1 Localisation génétique	61
6.3.2 Localisation physique	62
6.4 Identification et caractérisation du gène <i>gl</i>	64
6.4.1 Complémentation fonctionnelle par transgénèse	64
6.4.2 Identification de la mutation <i>gl</i>	65
6.4.3 Caractérisation de l'expression du gène <i>gl</i>	67
6.4.4 Caractérisation de la protéine Gl	69
6.5 Homologue de la protéine <i>grey-lethal</i>	71
6.5.1 Homologue humain de la protéine Gl	71
6.5.2 Mutation ostéopérotique du gène <i>Gl</i> humain	71
7. Rôle du gène <i>gl</i>	73

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	75
1. Constructions plasmidiques.....	76
1.1 Synthèse de l'ADNc de <i>gl</i>	76
1.2 Préparation de la construction pTYR-gl.....	77
1.3 Préparation de la construction pTRAP-gl	78
1.4 Préparation plasmidique sur gradient de chlorure de césium.....	79
2. Transgène et microinjection	81
2.1 Préparation des transgènes	81
2.2 Microinjection	81
3. Identification des souris transgéniques.....	81
3.1 Préparation de l'ADN.....	81
3.2 Identification des souris transgéniques par PCR.....	82
3.3 Caractérisation de l'intégrité du transgène par Southern	83
3.4 Synthèse d'une sonde radioactive	84
3.5 Préhybridation et hybridation.....	85
4. Établissement de lignées transgéniques.....	85
4.1 Croisements F1	85
5. Préparation de l'ARN.....	86
5.1 Extraction d'ARN des souris transgéniques TYR-gl	86
5.2 Extraction d'ARN des souris transgéniques TRAP-gl.....	87
6. Caractérisation de l'expression des transgènes	88
6.1 Expression du transgène TYR-gl	88
6.1.2 RT-PCR.....	88
6.2 Expression du transgène TRAP-gl	90
6.2.1 Northern.....	90
7. Complémentation phénotypique.....	91
7.1 Croisements F2.....	91
7.2 Phénotype et radiographie	91
7.3 Analyse histologique	92

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	96
SECTION A : Coloration du poil	97
1. Transgène spécifique aux mélanocytes	98
1.1 Construction pTYR-gl.....	98
2. Production et caractérisation de souris fondatrices	99
2.1 Identification des souris fondatrices TYR-gl	99
2.2 Caractérisation des souris fondatrices TYR-gl.....	99
3. Génération de lignées transgéniques TYR-gl.....	100
3.1 Croisements F1	100
4. Caractérisation de l'expression du transgène TYR-gl.....	102
4.1 Expression du transgène TYR-gl	102
4.2 Expression dépendante du nombre de copie du transgène TYR-gl.....	105
5. Complémentation phénotypique.....	106
5.1 Croisements F2.....	106
5.2 Complémentation phénotypique de la coloration du pelage	106
5.3 Phénotype ostéopétrotique	107
6. Nouveau phénotype de pelage.....	110
6.1 Dilution de la coloration du pelage des souris TYR-gl	110
SECTION B : Ostéopétrose.....	113
7. Transgène spécifique aux ostéoclastes	114
7.1 Construction pTRAP-gl.....	114
8. Production et caractérisation de souris fondatrices TRAP-gl.....	114
8.1 Identification des souris fondatrices TRAP-gl	114
8.2 Caractérisation des souris fondatrices TRAP-gl	115
9. Génération de lignées transgéniques TRAP-gl	116
9.1 Croisements F1	116
10. Caractérisation de l'expression du transgène	118
10.1 Expression du transgène TRAP-gl	118
10.2 Expression du transgène TRAP-gl au niveau des OCLs.....	119

11. Complémentation phénotypique.....	121
11.1 Croisements F2.....	121
11.2 Complémentation du phénotype ostéopérotique.....	121
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	125
1. La souris grey-lethal.....	126
2. Phénotype de la coloration du pelage chez la souris grey-lethal.....	127
3. Transgénèse ciblée aux mélanocytes.....	128
4. Complémentation phénotypique de la coloration du pelage	130
5. Dilution de la coloration du pelage des souris TYR- <i>gl</i>	131
5.1 Mutation d'insertion.....	132
5.2 Surexpression de Gl : Séquestration de partenaires protéiques.....	133
5.3 Surexpression de GL : Différenciation et apoptose des mélanocytes ...	134
6. Phénotype ostéopérotique de la souris grey-lethal.....	135
7. Transgénèse ciblée aux ostéoclastes.....	136
8. Complémentation phénotypique de l'ostéopérose	140
9. Rôle du gène <i>gl</i> dans l'homéostasie osseuse	141
9.1 Expression du gène <i>gl</i> dans un autre type cellulaire : les ostéoblastes...	141
9.2 Expression du gène <i>gl</i> dans les précurseurs des ostéoclastes.....	143
10. Fonction spéculative du gène <i>gl</i>	146
CONCLUSION.....	149
BIBLIOGRAPHIE	151
APPENDICE I	168
APPENDICE II.....	169
APPENDICE III	170
APPENDICE IV	171
APPENDICE V.....	172

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1 : Morphologie des os longs.	3
Figure 2 : Cycle du remodelage osseux.....	5
Figure 3 : Différenciation des ostéoblastes.	10
Figure 4 : Différenciation des précurseurs ostéoclastiques	16
Figure 5 : Interactions entre ostéoblastes et ostéoclastes	17
Figure 6 : Voie de différenciation et d'activation des ostéoclastes	20
Figure 7 : Polarisation et migration des ostéoclastes	21
Figure 8 : Site d'adhésion focale	23
Figure 9 : Mécanisme d'acidification de la lacune de résorption.....	28
Figure 10 : Mutants ostéopérotiques affectant l'ostéoclastogénèse	34
Figure 11 : Principales structures de la peau et du follicule pileux.....	39
Figure 12 : Voie de développement des mélanocytes	41
Figure 13 : Contrôle génétique de la différenciation des mélanocytes	45
Figure 14 : Voie de biosynthèse des mélanines	46
Figure 15 : Contrôle de la synthèse des mélanines	48
Figure 16 : Coloration du poil chez la souris agouti	50
Figure 17 : Phénotypes de la souris grey-lethal (<i>gl</i>).....	56
Figure 18: Caractérisation des ostéoclastes <i>gl</i>	59
Figure 19 : Carte génétique incluant le locus <i>gl</i>	62

Figure 20 : Carte physique de la région candidate pour le locus <i>gl</i>	63
Figure 21 : Identification du gène <i>gl</i>	66
Figure 22 : Caractérisation du gène <i>gl</i>	68
Figure 23 : Caractérisation et immunolocalisation de la protéine Gl.....	70

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 24 : Constructions	80
Figure 25: Croisements F1 et F2 des lignées transgéniques.	95

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Figure 26: Identification et caractérisation des souris TYR-gl.	101
Figure 27 : Analyse d'expression du transgène TYR-gl	104
Figure 28: Complémentation phénotypique de la coloration du pelage.....	108
Figure 29: Phénotype ostéopérotique des souris TYR-gl.....	109
Figure 30: Nouveau phénotype de la coloration du pelage	111
Figure 31: Distribution des pigments au niveau du pelage	112
Figure 32: Identification et caractérisation des souris TRAP-gl.	117
Figure 33: Expression du transgène TRAP-gl par analyse Northern	119
Figure 34: Expression du transgène TRAP-gl dans les ostéoclastes.....	122
Figure 35 : Phénotype ostéopérotique des souris TRAP-gl.	124

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Table I: Séquences des amorces PCR	93
Table II: Séquences des amorces RT-PCR.....	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc: ADN complémentaire

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

BAC : chromosome artificiel bactérien

°C: degré celsius

DNA: acide désoxyribonucléique

dNTP : désoxyribonucéoside triphosphate

gl : gène grey-lethal

Gl: protéine grey-lethal

kb : kilobase

ml: millilitre

ng : nanogramme

OCL: osteoclast like cell

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

μl: microlitre

RT-PCR: PCR-réaction de réverse transcription

UTR : région non traduite

YAC : chromosome artificiel de levure

DÉDICACE

À mon mari Joel ...

À mes parents...

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Il m'a permis de travailler sur un projet captivant et intéressant. Je le remercie pour l'aide technique, l'encadrement ainsi que pour le support financier qu'il m'a attribué tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également les membres du laboratoire qui m'ont aidée au cours de ces trois années. Un gros merci à Julie Desnoyers qui a préparé la construction tyrosinase lors de son stage.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer et de corriger mon mémoire.

Je remercie également mon mari, Joel, ainsi que mes parents et amis de m'avoir soutenue et encouragée durant mes études. Votre support et votre amour me sont très chers.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

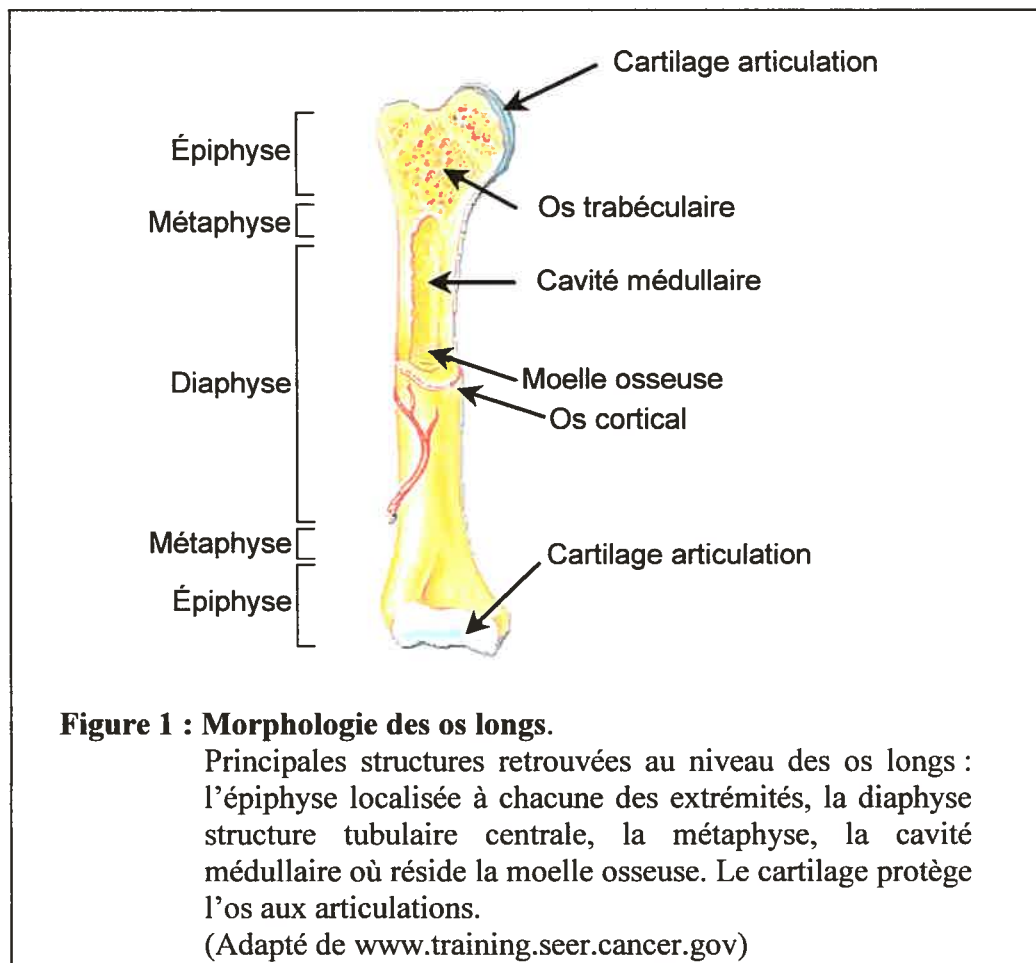
1. Le tissu osseux et l'homéostasie osseuse

1.1 Le tissu osseux

L'os est un tissu spécialisé qui conjointement avec le cartilage compose le système squelettique. Les os sont distribués à travers l'organisme et sont composés d'une matrice extracellulaire calcifiée. Ils assurent trois fonctions majeures soit la locomotion, la protection et l'homéostasie métabolique. En effet, le tissu squelettique constitue un site d'attachement pour le système musculaire ainsi qu'un support mécanique pour la locomotion. De plus, les os et le cartilage protègent des éléments physiques les organes vitaux et la moelle osseuse où niche le tissu hématopoïétique. Le système squelettique, de par sa composition organique et inorganique, est également un réservoir en ions calciques et en ions phosphates qui sont essentiels à l'homéostasie adéquate du métabolisme.

On distingue deux types d'os soit les os longs tels le tibia et le fémur et les os plats telles la boîte crânienne et la mandibule. Pour les os longs, on peut distinguer trois structures principales : l'épiphyse, localisée à chacune des extrémités, la diaphyse, structure tubulaire centrale où réside la moelle osseuse et la métaphyse (Figure 1). L'os cortical, composé de multiples couches compactes de tissu calcifié, constitue la partie externe de l'os tandis que l'os trabéculaire est limité à la région interne des os plats et à la métaphyse des os longs. Le tissu osseux est composé à 90% d'os cortical et à 10% d'os trabéculaire (Guise TA. *et al.* 1998). Constitués de la même matrice et des mêmes cellules, l'os cortical et l'os trabéculaire se

distinguent principalement par leur structure et leur fonction. En effet, plus de 90% du volume de l'os cortical est occupé par la matrice osseuse tandis que seulement 20% du volume de l'os trabéculaire est calcifié. Ainsi, l'os cortical comble une fonction plus mécanique et l'os trabéculaire une fonction plus métabolique.



Le tissu osseux est composé à la fois d'éléments minéraux et organiques. L'os est en grande partie composé de matrice extracellulaire, constituée principalement de fibres de collagène de type I soit plus de 90% des protéines totales de l'os (Mackie

EJ. 2003). Les autres constituants protéiques moins abondants sont des glycoprotéines (l'ostéonectine, l'ostéopontine, la fibronectine et la vitronectine) ainsi que des protéoglycans. La formation de cristaux d'hydroxyapatite permet à cette matrice extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes de se rigidifier.

1.2 Homéostasie osseuse

Le tissu squelettique n'est pas un organe statique. Il subit plutôt d'importants remaniements dictés par l'activité de deux types de cellules osseuses : les ostéoclastes qui dégradent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui génèrent cette même matrice. Ce processus complexe et dynamique appelé remodelage osseux survient en situation physiologique normale. Lors de la croissance, les os s'allongent et s'élargissent et, durant la vie adulte, le remodelage permet un renouvellement continu de la matrice osseuse et une homéostasie calcique adéquate. Il est à noter que le remodelage osseux permet au squelette une extraordinaire capacité à s'adapter aux contraintes extérieures (Currey JD. 2003). Ainsi, le remodelage osseux maintient la masse osseuse constante durant la vie adulte en assurant l'équilibre entre la formation et la résorption de la matrice osseuse.

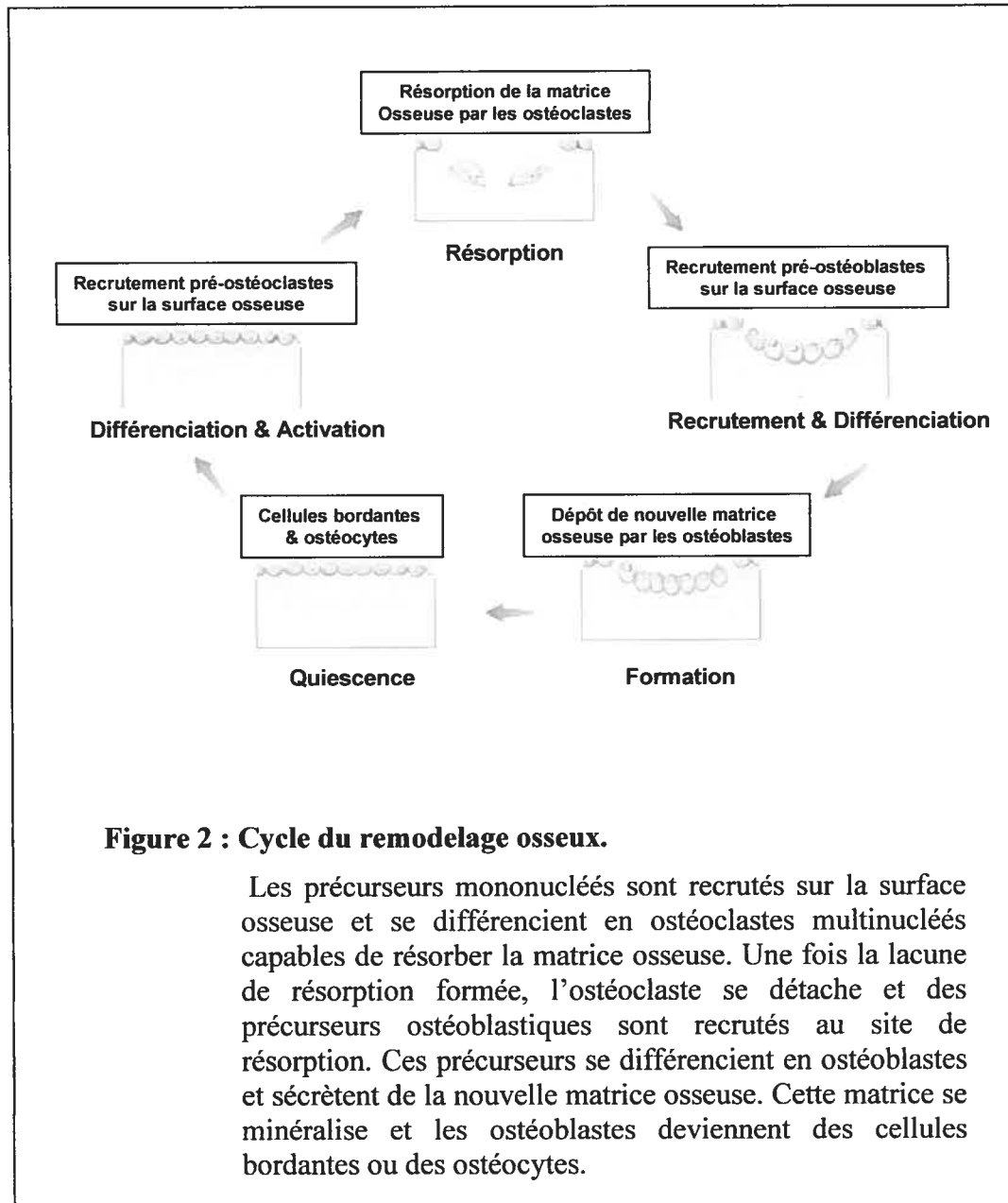


Figure 2 : Cycle du remodelage osseux.

Les précurseurs mononucléés sont recrutés sur la surface osseuse et se différencient en ostéoclastes multinucléés capables de résorber la matrice osseuse. Une fois la lacune de résorption formée, l'ostéoclaste se détache et des précurseurs ostéoblastiques sont recrutés au site de résorption. Ces précurseurs se différencient en ostéoblastes et sécrètent de la nouvelle matrice osseuse. Cette matrice se minéralise et les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes ou des ostéocytes.

Le déroulement d'un cycle de remodelage osseux est le suivant : les précurseurs mononucléés des ostéoclastes présents dans le sang et la moelle osseuse sont recrutés à la surface osseuse où se situent des ostéoblastes quiescents (Figure 2). Une phase de résorption de la matrice osseuse suit la différenciation des

précurseurs ostéoclastiques. Cette phase est relativement rapide, ne durant que quelques jours. Une fois la lacune de résorption formée, les ostéoclastes se détachent de la matrice osseuse pour être remplacés cette fois par des précurseurs d'ostéoblastes. Cette phase de résorption est suivie d'une phase de formation où les ostéoblastes matures déposent de la matrice osseuse nouvellement formée. Cette phase dure plus d'un mois. Une fois cette matrice formée et calcifiée, les ostéoblastes deviennent quiescents et bordent la surface de l'os. Une partie des ostéoblastes sont éliminés par apoptose, l'autre s'enfouit dans la matrice osseuse et devient des ostéocytes. Durant un cycle de remodelage, il existe donc une régulation complexe entre les ostéoclastes et les ostéoblastes, les deux principaux types cellulaires osseux.

La durée de chacune de ces différentes phases a été évaluée et un cycle complet de remodelage osseux dure entre trois à six mois. Il est à noter que compte tenu de sa structure et de sa surface de contact avec le tissu hématopoïétique, l'os trabéculaire subit fréquemment ce cycle de remodelage. Ainsi, un adulte renouvelle 25 % de son os trabéculaire et 4 % de son os cortical chaque année.

1.2 Désordre de l'homéostasie osseuse

La régulation du cycle de remodelage de l'os est cruciale afin d'assurer l'homéostasie osseuse adéquate. La dérégulation de ce cycle est généralement due à un déséquilibre entre l'activité des ostéoclastes et celle des ostéoblastes. Cette

dérégulation peut mener à l'apparition de diverses pathologies squelettiques humaines.

L'ostéoporose, pathologie bien connue, affecte principalement les femmes ménopausées. Cette pathologie est caractérisée par une diminution de la masse osseuse qui rend le squelette particulièrement fragile, les os étant sujets à de nombreuses fractures. Cette maladie peut survenir suite à une diminution de la formation osseuse (ostéopénie) ou à une augmentation de la résorption osseuse. Des modèles animaux ont permis de démontrer que la baisse de production d'œstrogènes serait une des principales causes de l'ostéoporose. En effet, la diminution d'œstrogènes, reproduite chez la souris par ovariectomie, induit l'augmentation de la différenciation des ostéoclastes. De plus, on peut noter chez ces animaux une baisse significative du niveau d'apoptose des ostéoclastes présents dans l'os.

Contrairement à l'ostéoporose, l'ostéopétrose se traduit par une augmentation de la masse osseuse. Cette pathologie est également caractérisée par une diminution de la cavité médullaire des os longs où se situe le tissu hématopoïétique ou moelle osseuse. Les os devenus plus rigides sont également plus susceptibles aux fractures. Cette maladie est plus rare chez les humains et résulte dans une grande partie des cas d'une activité réduite des ostéoclastes. L'ostéosclérose est une autre pathologie osseuse caractérisée par une accumulation de matrice osseuse qui résulte plutôt d'une augmentation de l'activité des ostéoblastes. Différentes

mutations, soit dans des gènes directement impliqués dans l'ostéoclastogénèse ou indirectement via la régulation des ostéoblastes, sont responsables de cette pathologie.

La maladie de Paget est caractérisée par une dysmorphie des os due à un remodelage osseux excessif et désordonné. Chez ces patients, le remodelage osseux est accéléré dû à une suractivité des ostéoclastes menant alors les ostéoblastes à former une matrice osseuse anormale et désorganisée.

L'ostéomalacie, qui signifie "les os mous", est une autre pathologie osseuse. Lorsqu'il y a dérégulation ou insuffisance de minéraux, les ostéoblastes sont incapables de minéraliser adéquatement la matrice osseuse et de plus, s'y accumulent anormalement. Une grande majorité des cas d'ostéomalacie est liée à un défaut métabolique ou à une carence de la vitamine D.

L'apparition de lésions osseuses, appelée ostéolyse, peut être due à la présence de cellules cancéreuses. En effet, certaines métastases sécrètent des facteurs, principalement le TNF (*tumour necrosis factor*), capable de stimuler localement la résorption. Ceci est également le cas pour de nombreux processus inflammatoires au niveau des articulations menant à l'arthrite rhumatoïde.

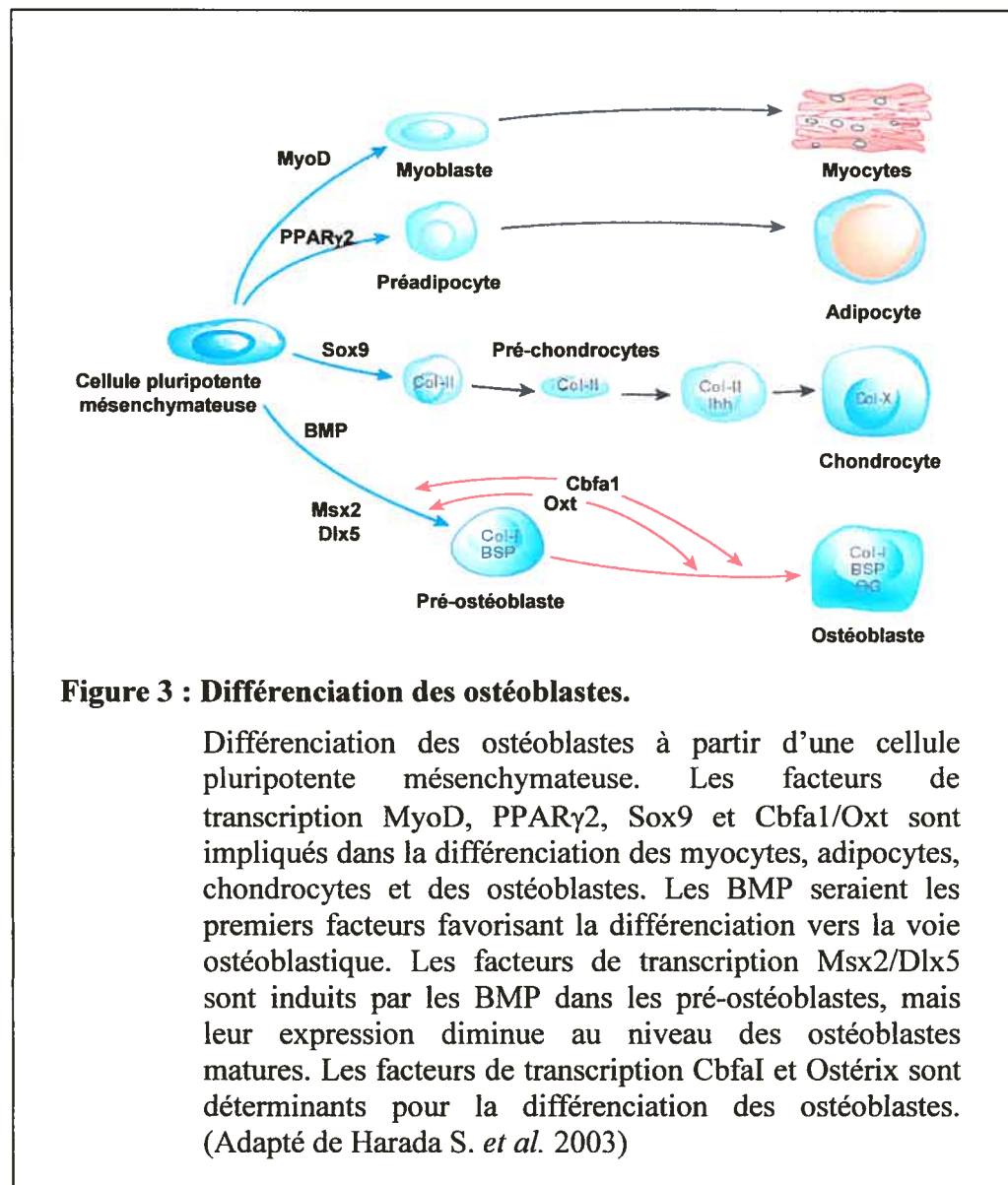
2. Ostéoblastes et ostéoclastes

2.1 L'ostéoblaste et la formation osseuse

L'ostéoblaste est une cellule hautement spécialisée responsable de la formation et de la minéralisation de la matrice osseuse. L'ostéoblaste joue un rôle important dans le cycle de remodelage ainsi que dans la régulation de l'activité de l'ostéoclaste. Il est donc important d'aborder l'origine et le rôle de ce type cellulaire.

2.1.1 Origine et différenciation de l'ostéoblaste

Il existe deux types d'ossification soit l'ossification endochondrale et l'ossification membranaire (Karsenty G. 1999). L'ossification endochondrale, retrouvée principalement au niveau des os longs, est caractérisée par le dépôt de la matrice osseuse sur une matrice cartilagineuse. L'ossification membranaire, qui se fait au niveau des os plats, résulte d'une apposition directe de la matrice osseuse par les ostéoblastes. Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de précurseurs mésenchymateux dérivés de la crête neurale (Katagiri T. *et al.* 2002, Aubin JE. 2001). Au niveau des os longs, les ostéoblastes peuvent également provenir de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire. Cette cellule pluripotente mésenchymateuse a également le potentiel de se différencier en cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires ou adipocytaires sous l'influence de différents facteurs de transcription (Figure 3) (Rodan G. 2003).



L'induction de la différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de facteurs autocrine et paracrine ainsi que de différents facteurs transcriptionnels. Les BMP (*bone morphogenic protein*) sont les premiers facteurs qui induisent la différenciation en cellules ostéoprogénitrices (Schmitt JM. *et al.* 1999, Wozney

JM. 1992, Karsenty G. *et al.* 2002). Ces protéines, membres de la grande famille des TGF β (*transforming growth factor beta*), ont la capacité d'induire la formation ectopique de tissus osseux (Takaoka K. *et al.* 1988). Msx2 et Dlx5 sont deux facteurs de transcription à homéodomaine induits par la cascade de signalisation des BMP (Dodig M. *et al.* 1999, Miyama K. *et al.* 1999, Karsenty G. 1998 Hogan BL. 1996). Ces deux facteurs sont fortement exprimés au niveau des pré-ostéoblastes, mais leur expression diminue au niveau des ostéoblastes matures. Cbfa1/Runx2 est un facteur transcriptionnel clef de la différenciation et de la fonction des ostéoblastes qui régule l'expression de gènes spécifiques tels que la phosphatase alcaline, le collagène de type I et l'ostéopontine (Ducy P. *et al.* 1997, Banerjee C. *et al.* 1997). L'ablation du gène Cbfa1/Runx2 produit, chez la souris, la formation d'un squelette complètement cartilagineux dû à l'absence complète d'ostéoblastes matures (Thirunavukkarasu K. *et al.* 2000, Mundlos S. *et al.* 1997, Otto F. *et al.* 1997). Récemment, des études *in vitro* ont démontré l'existence d'un nouveau facteur de transcription, ostérix, présent dans les pré-ostéoblastes. Le niveau d'expression de ce dernier est augmenté en réponse au BMP dans les ostéoblastes (Kadowaki A. *et al.* 2004, Lee MH. *et al.* 2003, Yagi K. *et al.* 2003). Tout comme Cbfa1/Runx2, ostérix est également essentiel à la différenciation et à la fonction des ostéoblastes (Nakashima K. *et al.* 2002). Contrairement à Cbfa1/Runx2, les cibles transcriptionnelles d'ostérix sont encore peu connues.

2.1.2 Fonction de l'ostéoblaste

Les ostéoblastes ont donc un rôle primordial dans la formation ainsi que dans le maintien du tissu osseux. Une fois l'ostéoblaste complètement différencié, celui-ci commence à sécréter des protéines de la matrice osseuse. Le collagène de type I est le principal composant, représentant plus de 90% des protéines totales de la matrice (Mackie EJ. 2003). Le réseau établi par les fibres de collagène forme une structure idéale pour ancrer l'os minéralisé. Les ostéoblastes sécrètent aussi d'autres types de protéines telles que des protéoglycans et des glycoprotéines (Heinegard D. *et al.* 1989). Les glycoprotéines sécrétées par les ostéoblastes, telles que l'ostéonectine et la fibronectine, sont impliquées dans la régulation de l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des cellules osseuses (Mackie EJ. *et al.* 1996). Les ostéoblastes sont également responsables de la minéralisation de la matrice osseuse. L'os minéralisé est formé de cristaux d'hydroxyapatite, cristaux riches en minéraux principalement le calcium et le phosphate. Ainsi, l'apport de calcium et de phosphate au site de minéralisation se fait par diffusion passive et par transport actif à travers des pompes spécialisées localisées dans la membrane des ostéoblastes. La formation initiale des cristaux est assistée par des macromolécules de la matrice telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine, la sialoprotéine et des phosphoprotéines (Termine, JD. *et al.* 1981, Reinholt, FP. *et al.* 1990). De plus, l'ostéoblaste contribue au processus même de minéralisation en sécrétant des enzymes telles que la phosphatase alcaline qui régule l'état d'activation des phosphoprotéines (Christenson RH. 1997).

Les ostéoblastes ont également un rôle primordial dans la régulation de la différenciation et l'activité des cellules résorptives, les ostéoclastes. La différenciation des ostéoclastes nécessite la présence de deux facteurs qui sont fournis par les ostéoblastes (Figure 5). Ainsi, les ostéoblastes matures et les précurseurs stromaux sécrètent le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) et expriment à leur surface RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*) qui lie son récepteur (RANK) sur les précurseurs des ostéoclastes (Yasuda H. *et al.* 1998, Udagawa N. *et al.* 1999). De plus, les ostéoblastes sécrètent également l'OPG (*osteoprotegerin*), un antagoniste du récepteur RANK, inhibant ainsi la différenciation et l'activité des ostéoclastes matures (Simonet, W. *et al.* 1997).

2.1.3 Régulation de l'ostéoblaste

De par sa composition, le tissu squelettique est un réservoir de calcium. Ainsi, les hormones qui contrôlent l'homéostasie calcique influencent la formation et la résorption osseuse. La PTH (hormone parathyroïdienne) stimule la croissance et la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques (Karaplis AC. *et al.* 2000, Strewler GJ. 2001). La vitamine D est également un régulateur de l'homéostasie calcique régulant la transcription des gènes qui sont caractéristiques de l'ostéoblaste mature (van Leeuwen JP. *et al.* 2001). Des études plus récentes ont démontré que la leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes, peut également contrôler l'activité des ostéoblastes (Ducy P. *et al.* 2000a). Un des plus puissants

inhibiteurs de la formation osseuse, la leptine, agit indirectement sur les ostéoblastes via son récepteur localisé à l'hypothalamus (Ducy P. *et al.* 2000b). Ces divers facteurs jouent un rôle de régulateur moléculaire de la formation osseuse au niveau des précurseurs ostéoblastiques ainsi que sur les ostéoblastes matures.

2.2 L'ostéoclaste et la résorption osseuse

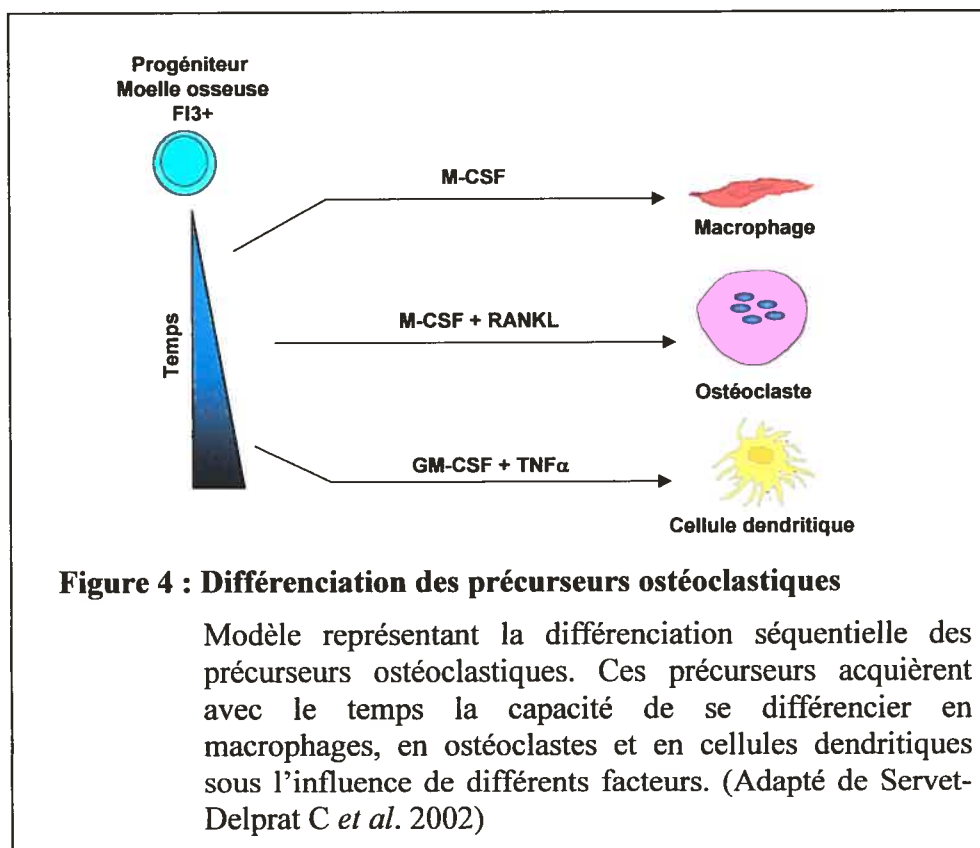
L'ostéoclaste est une cellule bien particulière dont la fonction principale est de dégrader le tissu où elle se situe. De par sa fonction, l'ostéoclaste joue un rôle central dans la formation du squelette ainsi dans la régulation de la masse osseuse. Pendant longtemps, ce type cellulaire était méconnu compte tenu de la difficulté d'en isoler un nombre suffisant à partir du tissu osseux. Dans la dernière décennie, la génération de modèles animaux a permis d'identifier plusieurs facteurs essentiels à la différenciation, la fonction et la régulation de l'activité des ostéoclastes. De plus, la fonction et la régulation de l'activité de l'ostéoclaste sont maintenant mieux connues grâce à la mise au point d'un modèle d'ostéoclaste généré en culture, les OCLs (*Osteoclast Like Cell*) (Severson AR. 1983, Takahashi N. *et al.* 1988, Kassem M. *et al.* 1991). L'ostéoclaste est une cellule volumineuse de 10 à 100 μm de diamètre qui contient entre 4 à 20 noyaux regroupés au centre de la cellule. L'appareil de Golgi y est très développé et localisé autour de chaque noyau et on y retrouve d'importantes quantités de lysosomes. Une anomalie de la fonction de résorption de l'ostéoclaste entraîne des pathologies telles que

l'ostéoporose ou l'ostéopétrose selon que la résorption est supérieure ou inférieure à la formation osseuse. Ainsi, afin de mieux comprendre ces pathologies, il est important de connaître les différentes étapes et les différents facteurs qui influencent la différenciation et la fonction de résorption des ostéoclastes.

2.2.1 Origine et différenciation de l'ostéoclaste

Les premiers travaux ont démontré qu'une transplantation de moelle osseuse permettait, chez la souris, de corriger l'ostéopétrose (Walker DG. 1975). Ainsi, ces études ont permis de mettre en évidence l'origine hématopoïétique des ostéoclastes. L'ostéoclaste décrit pour la première fois en 1873 par Albert Kölliker est une cellule multinucléée formée par la fusion cellulaire de précurseurs mononucléés de la famille des monocytes/macrophages (Figure 4) (Lerner UH. 2000, Udagawa N. *et al.* 1990). Ces précurseurs peuvent, en fonction des facteurs de croissance présents dans leur environnement, également se différencier en monocytes/macrophages, en cellules dendritiques, ou en ostéoclastes (Figure 4) (Servet-Delprat C. *et al.* 2002). Les ostéoclastes sont bien différents des macrophages et expriment des facteurs qui leur sont propres tels que la phosphatase TRAP (*Tartrate Resistant Acid Phosphatase*) et l'intégrine αV - $\beta 3$ (Teitelbaum SL. 1993).

Il est maintenant bien établi que la différenciation des ostéoclastes nécessite des interactions directes avec des cellules stromales ou des ostéoblastes présents dans



la moelle osseuse (Figure 5) (Takahashi N. *et al.* 1988). Les trois facteurs majeurs contrôlant la différenciation et/ou la fonction des ostéoclastes sont le M-CSF, RANKL et son antagoniste OPG (Kong YY. *et al.* 1999, Yoshida H. *et al.* 1990). Ces facteurs sont soit exprimés à la surface des cellules stromales/ostéoblastes (RANKL) ou sécrétés directement dans le micro-environnement osseux (OPG, RANKL soluble) (Myint YY. *et al.* 1999). Des études *in vitro* ont clairement démontré que l'addition de M-CSF et de RANKL était suffisante pour induire la différenciation des précurseurs monocytaires en ostéoclastes (Tsurukai T. *et al.* 2000, Arai F. *et al.* 1999). Par contre, l'addition d'OPG inhibe complètement la différenciation ostéoclastique. M-CSF et RANKL existent sous deux formes soit

membranaire et soluble. RANKL est un membre de la famille des TNF et la forme soluble résulte du clivage de sa forme transmembranaire par des métalloprotéases de type ADAM (Nakashima T. *et al.* 2000). RANK et OPG sont également des membres de la famille des récepteurs du TNF. OPG est un récepteur soluble qui est similaire au récepteur RANK localisé sur les précurseurs ostéoclastiques. OPG compétitionne avec RANK pour la liaison au RANKL et bloque ainsi l'activation de RANK et par le fait même la différenciation ostéoclastique (Figure 5).

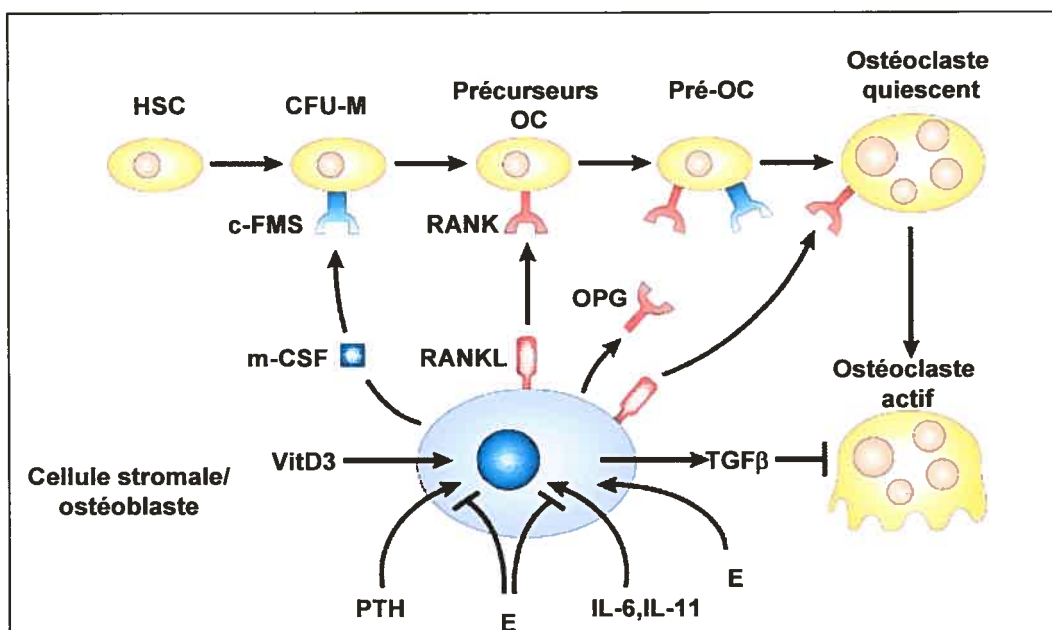


Figure 5 : Interactions entre ostéoblastes et ostéoclastes

La différenciation des ostéoclastes nécessite la présence de deux facteurs qui sont fournis par les ostéoblastes soit M-CSF et RANKL. L'ostéoblaste sécrète aussi l'OPG, un antagoniste du récepteur RANK exprimé par les précurseurs ostéoclastiques. La quantité de M-CSF et RANKL exprimée par les cellules stromales/ostéoblastes est contrôlée positivement par la PTH, VitD3, IL-6, IL11 et négativement par divers autres facteurs tels que les œstrogènes. Les œstrogènes (E) favorisent aussi la sécrétion par les ostéoblastes du TGFβ, un puissant inhibiteur de l'activité des ostéoclastes. (Adapté de Goltzman D. 2002)

La différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures consiste en plusieurs autres étapes en aval et en amont de RANK/RANKL (Figure 6). Le facteur transcriptionnel à homéodomaine PU.1 est un des premiers facteurs impliqués dans la différenciation des ostéoclastes. L'expression de PU.1 est essentielle à l'engagement des précurseurs myéloïdes vers la voie monocytes/macrophages (Tondravi MM. *et al.* 1997). En plus d'en assurer la différenciation, M-CSF et son récepteur c-fms jouent un rôle prolifératif en favorisant la survie des pré-ostéoclastes (Figure 6) (Arai F. *et al.* 1999). Le facteur de transcription de type AP1, c-Fos, est également impliqué dans la différenciation des ostéoclastes. Ce facteur favorise la différenciation des précurseurs hématopoïétiques vers la voie ostéoclastique au dépend de la voie de différenciation des macrophages (Grigoriadis AE. *et al.* 1994). Un autre facteur transcriptionnel Mitf est nécessaire à une étape ultérieure soit lors de la fusion de ces précurseurs (Jenkins NA. *et al.* 1993, Thesingh CW. *et al.* 1985). Récemment, des essais *in vitro* ont démontré que le facteur de transcription NFAT2 a aussi un rôle essentiel dans la différenciation des ostéoclastes en réponse au RANKL (Ishida N. *et al.* 2002, Takayanagi H. *et al.* 2002).

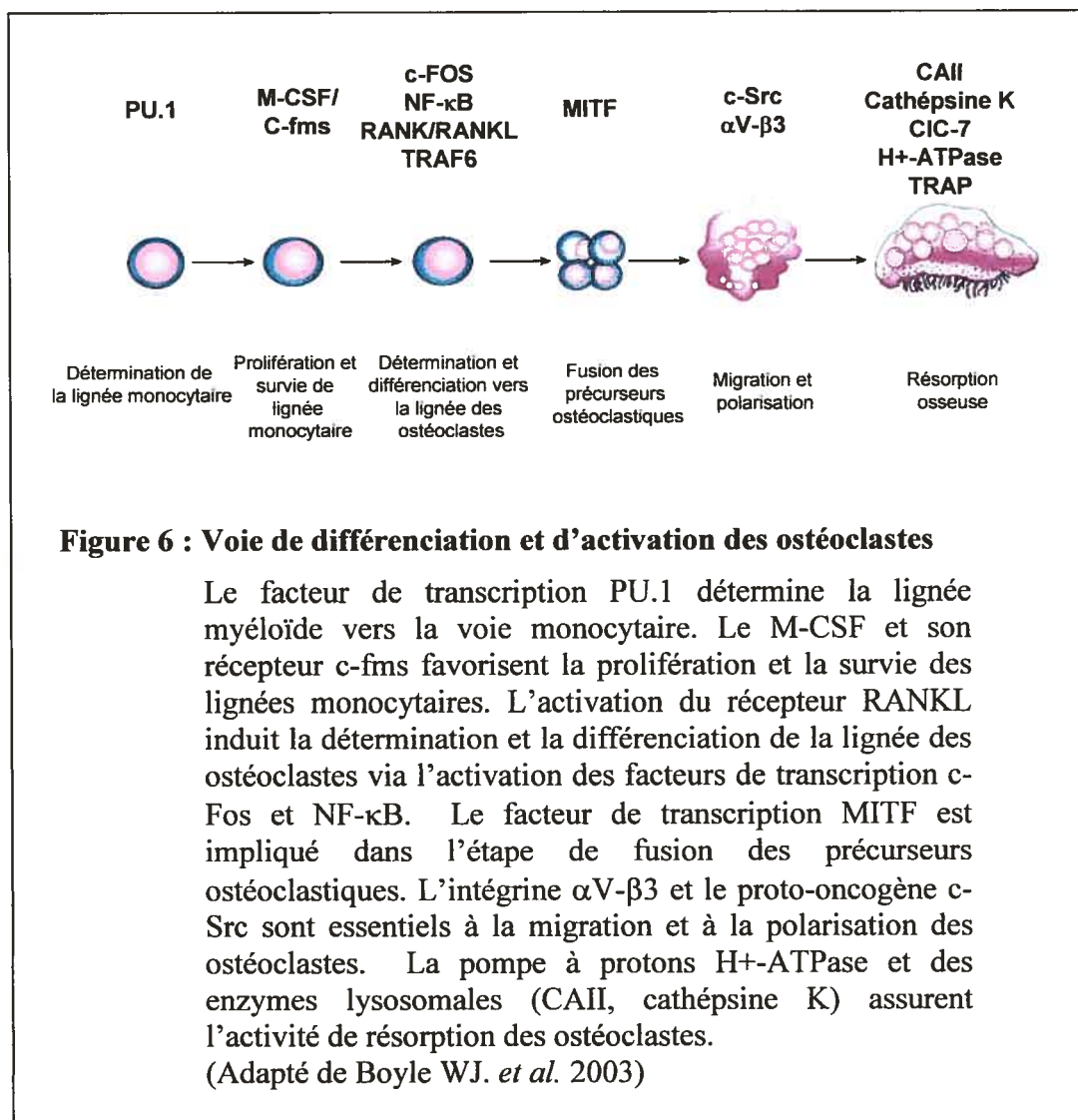
Des facteurs intracellulaires de signalisation agissant en aval du récepteur RANK ont également une fonction importante dans la différenciation ostéoclastique. Le récepteur RANK est connu pour activer le facteur de transcription NF- κ B dans les cellules dendritiques et la voie de Jun kinases (JNK) dans les lymphocytes T

(Anderson DM. *et al.* 1997, Wong BR. *et al.* 1997). Il est fort probable que l'ostéoclastogénèse induite par RANKL au niveau des ostéoclastes emprunte les mêmes voies de signalisation (Franzoso G. *et al.* 1997, Hsu H. *et al.* 1999). Comme pour la plupart des autres récepteurs de la famille de TNF qui n'ont pas d'activité kinase, l'activation par RANKL induit l'ancrage des protéines de la famille TRAF (*TNFR-associated factor*) sur le domaine cytoplasmique du récepteur RANK. TRAF6 et c-Src sont des médiateurs de signalisation essentiels à l'activation de l'ostéoclaste (Soriano P. *et al.* 1991, Lomaga MA. *et al.* 1999). Ces protéines sont recrutées au niveau de la région intracellulaire du récepteur RANK et induisent l'activation subséquente de la voie de NF- κ B et des JNK (Burgess TL. *et al.* 1999).

D'autres facteurs essentiels à l'ostéoclastogénèse interviennent plus tardivement dans la voie de différenciation (Figure 6). Le proto-oncogène c-src et les intégrines α V β 3 sont impliqués dans la migration, l'attachement et la polarisation des ostéoclastes. Des protéines spécialisées telles que la pompe à proton v-ATPase, le canal de chlore ClC7, l'anhydrase carbonique et la catépsin K sont importants en ce qui concerne la fonction résorptive de l'ostéoclaste (Li YP. *et al.* 1999, Kornak U. *et al.* 2001, Hu PY. *et al.* 1992, Saftig P. *et al.* 1999).

D'autres facteurs influencent également la différenciation des ostéoclastes. En effet, des agents tels que l'hormone parathyroïdienne (PTH), la vitamine D et

certaines interleukines (IL-6 et IL-11) peuvent influencer l'ostéoclastogénèse (Figure 5). Ces agents agissent en modifiant le niveau d'expression de RANKL et/ou d'OPG par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse. Par contre, d'autres facteurs tels que TNF et IL-1 agissent directement sur les précurseurs ostéoclastiques.



2.2.2 Fonction de l'ostéoclaste

L'ostéoclast fonctionne de manière cyclique alternant des phases de résorption active et des phases de migration le long de la surface osseuse. Au repos ou en migration, l'ostéoclast est une cellule relativement étalée sans polarité membranaire particulière. En résorption active, l'ostéoclast acquiert une polarisation avec la formation d'une membrane spécialisée (*ruffled border*) au contact de l'os (Duong LT. *et al.* 1998). Après différenciation, les ostéoclastes matures qui bordent la surface osseuse acquièrent des caractéristiques morphologiques particulières. L'attachement de l'ostéoclaste à la matrice enclenche la formation d'une zone d'attachement étanche (*sealing zone*) qui scelle la lacune de résorption et circonscrit la bordure plissée (*ruffled border*) (Figure 7).

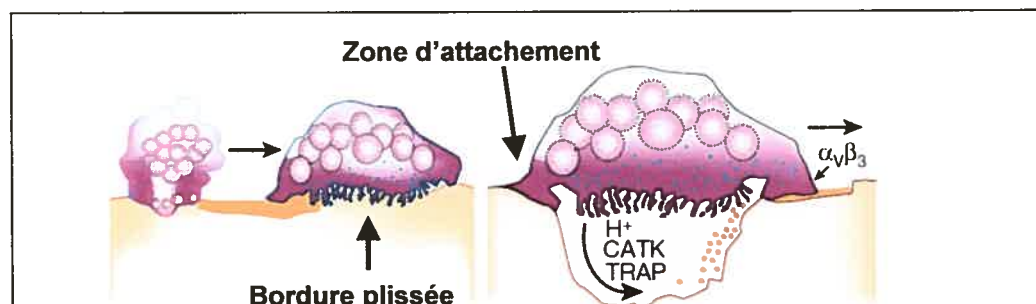


Figure 7 : Polarisation et migration des ostéoclastes

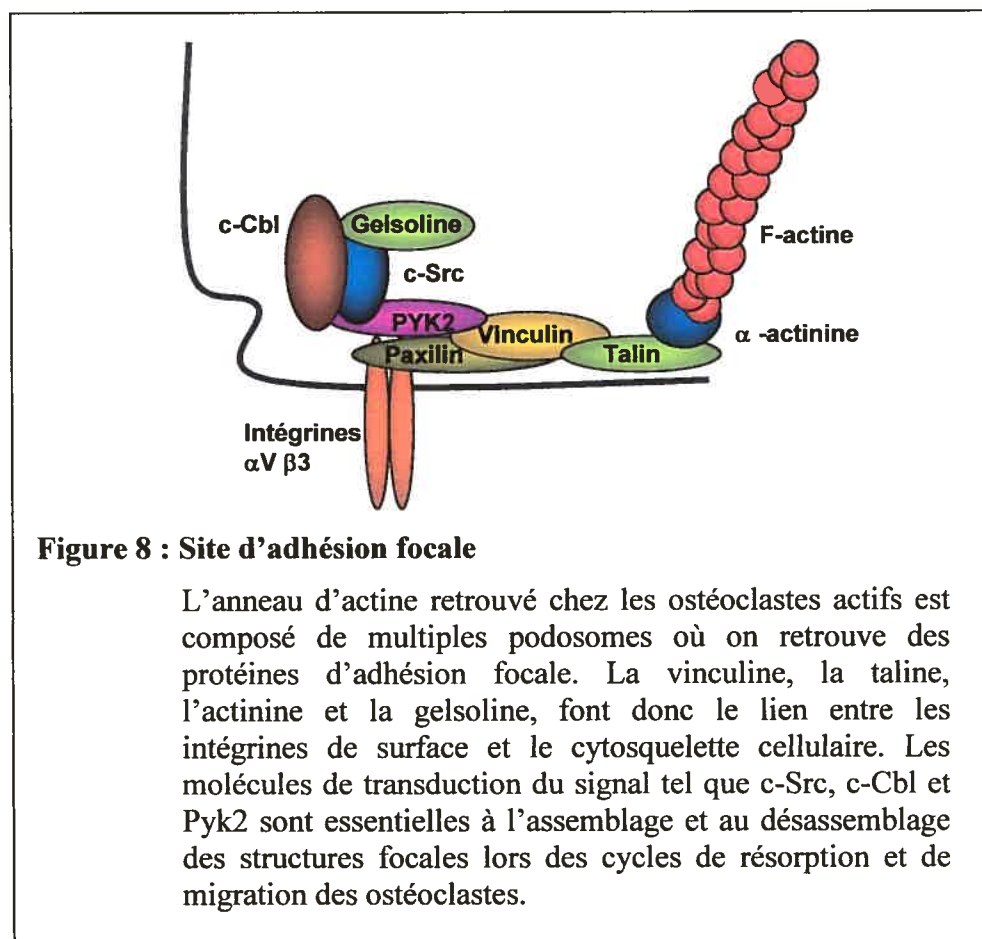
L'attachement à la matrice osseuse via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induit la polarisation de l'ostéoclaste. Ce dernier acquiert une structure spécialisée, la bordure plissée, sur le pôle apical de la cellule. Ces multiples replis membranaires sont formés par la fusion de multiples vésicules intracellulaires. La bordure plissée est le site de sécrétion de protons et d'enzymes nécessaires à la résorption. La dissociation des intégrines permet le détachement et la migration de la cellule. (Adapté de Boyle WJ. *et al.* 2003)

2.2.2.1 Migration et attachement de l'ostéoclaste

L'ostéoclaste actif se déplace le long de la surface osseuse, créant une succession de lacunes de résorption et de migration. La première étape de dégradation de la matrice osseuse consiste en l'attachement de l'ostéoclaste à la matrice osseuse. Des récepteurs membranaires contrôlent en grande partie le recrutement et la motilité de l'ostéoclaste. En effet, les intégrines et plus particulièrement l'intégrine $\alpha V \beta 3$, le récepteur de la vitronectine, sont déterminants pour l'adhésion, la motilité ainsi que l'activation des ostéoclastes (Vaananen HK. *et al.* 1995). Des études *in vitro* ont démontré que l'intégrine $\alpha V \beta 3$ reconnaît la séquence RDG (Arg-Gly-Asp) présente dans les protéines de la matrice osseuse (Engleman VW. *et al.* 1997). De plus, les intégrines jouent un rôle de signalisation induisant des modifications au niveau du cytosquelette de l'ostéoclaste menant à la formation de la bordure plissée.

Pendant la résorption, l'ostéoclaste subit un remaniement de son cytosquelette d'actine et ce, principalement au niveau de la zone d'attachement. Un anneau d'actine, particulièrement riche en F-actine, se forme et délimite la bordure plissée et la zone de résorption (Vaananen HK. *et al.* 1995). Cet anneau est en fait composé de multiples podosomes dans lesquels les filaments d'actine sont orientés perpendiculairement à la surface osseuse (Chellaiah M. *et al.* 2000). Cette structure spécialisée n'est présente que lorsque l'ostéoclaste est actif et disparaît lorsque celui-ci est en déplacement. Des protéines d'adhésion focale impliquées

lorsque celui-ci est en déplacement. Des protéines d'adhésion focale impliquées dans des interactions cellule/matrice sont localisées dans les podosomes. Ces protéines, telles que la vinculine, la taline, l'actinine et la gelsoline, font donc le lien entre les intégrines de surface et le cytosquelette intracellulaire (Lakkakorpi *et al.* 1993). Des molécules de transduction du signal telles que c-Src, c-Cbl et Pyk2 sont également présentes au site d'adhésion focale (Figure 8). Ces protéines sont essentielles à l'assemblage et au désassemblage des structures focales lors des cycles de résorption et de migration des ostéoclastes (Wang Q. *et al.* 2000, Duong LT. *et al.* 1998).



La bordure plissée circonscrite par l'anneau d'actine est également essentielle à l'activité de l'ostéoclaste. La bordure plissée est formée par la fusion de diverses vésicules intracellulaires acides avec la membrane plasmique adjacente à la matrice osseuse. Cette structure localisée sur le côté apical de l'ostéoclaste est riche en vésicules qui, une fois sécrétées, assureront la résorption de la matrice osseuse. Les multiples replis membranaires ainsi formés augmentent considérablement la surface de contact entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse (Blair HC. *et al.* 1989). Le trafic vésiculaire est donc important pour la formation ainsi que la fonction de la bordure plissée. Parmi d'autres, la protéine Rab7, membre de la famille des petites protéines G, a un rôle majeur dans la formation de cette structure (Palokangas H. *et al.* 1997). Cette protéine principalement localisée sur les endosomes tardifs est un important régulateur du trafic vésiculaire impliqué dans la polarisation et l'activation des ostéoclastes (Zhao H. *et al.* 2000, Zhao H. *et al.* 2001).

2.2.2.2 Dissolution et dégradation de la matrice osseuse

Une fois l'ostéoclaste attaché à l'os, ce dernier doit former un microenvironnement spécialisé entre la cellule et la matrice osseuse favorable à la résorption. Pour ce faire, l'ostéoclaste crée un milieu acide (pH 5) où des enzymes lysosomales vont dissoudre la matrice osseuse (minérale et organique). Ce microenvironnement, isolé par la zone d'attachement, est donc très propice à la résorption osseuse (Blair HC. *et al.* 1986).

Une des premières étapes de la résorption consiste en l'acidification de la lacune de résorption sous les ostéoclastes (Figure 9). La membrane apicale, particulièrement au niveau de la bordure plissée de l'ostéoclaste actif, est le siège d'une sécrétion de protons qui acidifient la lacune de résorption (Blair HC. *et al.* 1991). Parmi d'autres, une pompe à protons, H^+ -ATPase, assure chez l'ostéoclaste le transport des ions du cytoplasme vers la lacune de résorption (Chatterjee D. *et al.* 1993). Cette pompe composée de diverses sous-unités ressemble aux pompes des lysosomes et aux pompes localisées sur les membranes tubulaires rénales. Seule une des sous-unités de ce complexe protéique est spécifique aux ostéoclastes et est essentielle à son activité dans ce type cellulaire (Chatterjee D. *et al.* 1992, Li YP. *et al.* 1999, Scimeca JC. *et al.* 2000). Des canaux à chlore sont également localisés dans la bordure plissée des ostéoclastes actifs et assurent l'équilibre de charges entre le cytoplasme et la lacune de résorption (Blair HC. *et al.* 1991, Kornak U. *et al.* 2001). Le pH intracellulaire et le potentiel transmembranaire des ostéoclastes actifs sont maintenus constants grâce à des pompes localisées sur les membranes basolatérales de la cellule. Un canal échangeur d'acide (Na^+/H^+) et de bases (HCO_3^-/Cl^-) reconstitue les niveaux ioniques intracellulaires (Ravesloot JH. *et al.* 1995, Teti A. *et al.* 1989).

L'ostéoclaste synthétise plusieurs enzymes et métalloprotéases qui sont essentielles à la résorption de la matière osseuse. Ces enzymes capables d'agir en condition acide sont conservées dans des vésicules intracellulaires ou sécrétées

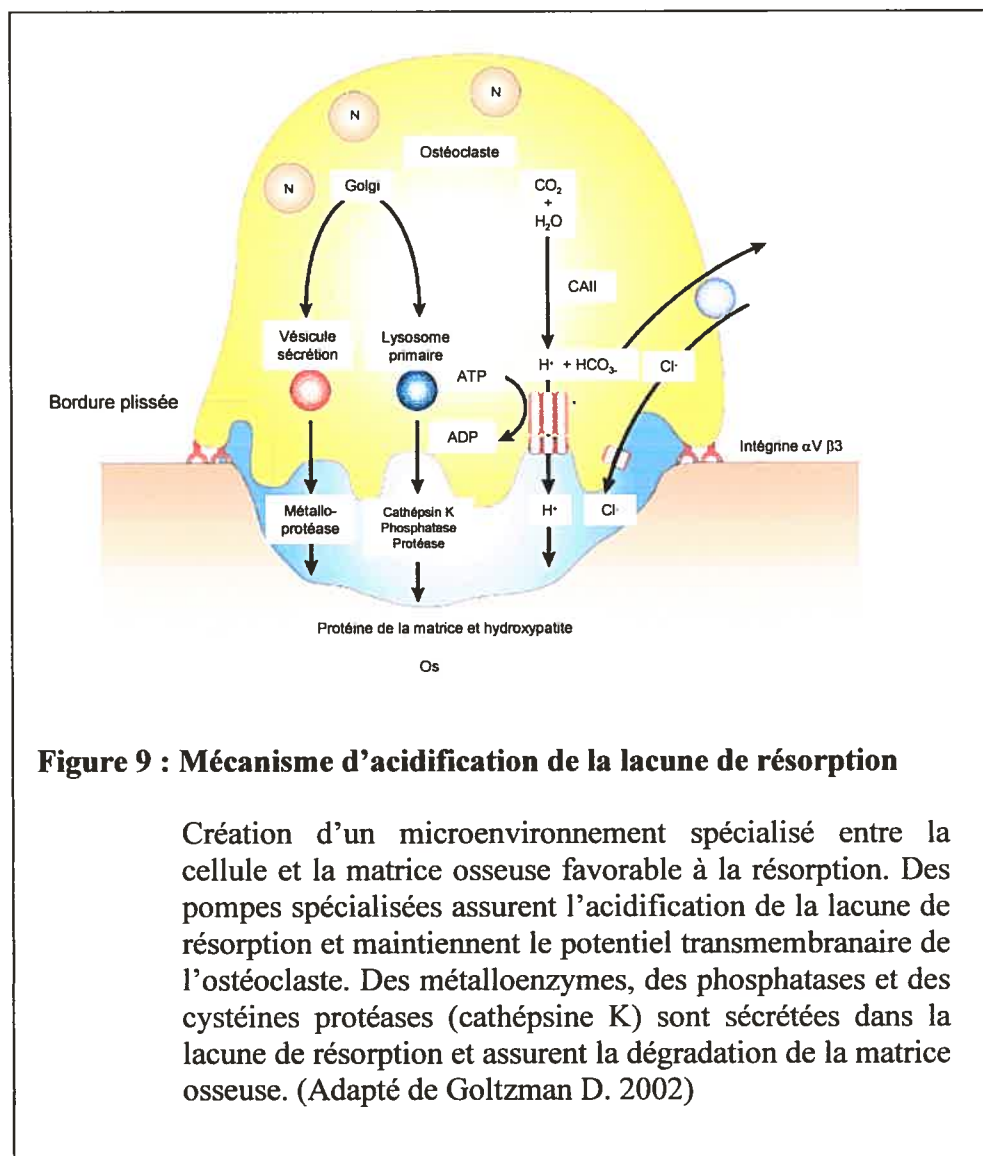
dans la lacune de résorption. Des enzymes tels que l'arylsulfatase, la β -glucoronidase, la β -glycérophosphatase ainsi que des cystéines protéases dégradent les composés organiques et inorganiques de l'os (Baron R. *et al.* 1988). Les cystéines endopeptidases de la famille des cathépsines, plus particulièrement la cathépsine K, sont essentielles à la dégradation de l'os (Gowen M. *et al.* 1999). Cette dernière est capable d'hydrolyser le collagène présent dans la matrice osseuse à pH acide (Saftig P. *et al.* 1998). Des métalloprotéases telles que des gélatinases et collagénases participent également à la résorption osseuse (Teitelbaum SL. 2000). La métalloprotéase TRAP (*tartrate resistant acid phosphatase*) est un excellent marqueur des ostéoclastes actifs (Minkin C. 1982) et cette enzyme semble aussi être essentielle à la dégradation quoique son mécanisme d'action précis n'ait pas encore été identifié (Hayman AR. *et al.* 1996). Une fois sécrétée dans la lacune de résorption, TRAP semble être endocytée conjointement avec les débris osseux qui sont transportés vers le pôle basolatéral de l'ostéoclaste. Cette enzyme pourrait continuer l'hydrolyse des produits de dégradation à l'intérieur de la vésicule de transcytose (Nesbitt SA. *et al.* 1997).

2.2.3 Contrôle de la résorption

Ainsi, l'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique en alternant un état actif de résorption et de migration. Or, les facteurs contrôlant ces cycles ne sont pas tout à fait connus. Le contrôle de l'activité de l'ostéoclaste est complexe et est probablement régulé par l'homéostasie du calcium. L'augmentation de la

concentration du calcium à l'intérieur même de la lacune de résorption déclenche le détachement et la migration de la cellule. Chez la souris, le temps de vie d'un ostéoclaste est d'environ 2 semaines; ainsi, après un certain nombre de cycles, l'ostéoclaste entre en apoptose et disparaît.

L'activité de résorption de l'ostéoclaste est également contrôlée par le nombre d'ostéoclastes matures présents sur l'os ainsi que les niveaux de différenciation des précurseurs. Plusieurs études ont démontré l'activité négative des oestrogènes sur la résorption. Cette régulation s'exerce surtout par l'induction de l'apoptose chez l'ostéoclaste par l'activation du $TGF\beta$ (Hughes DE *et al.* 1996). Plusieurs facteurs contrôlent l'activité des ostéoclastes indirectement en agissant via les ostéoblastes. La PTH est ainsi impliquée dans l'induction de la différenciation et l'activité des ostéoclastes, mais ce, via l'inhibition de l'apoptose des ostéoblastes (Jilka RL. *et al.* 1996).



3. Désordres squelettiques et modèles animaux

L'analyse de nombreuses mutations génétiques affectant le squelette, qu'elles soient spontanées ou induites, explique la progression de nos connaissances sur le développement osseux et l'homéostasie osseuse (Figure 10). Aujourd'hui, une grande partie des gènes et des facteurs impliqués dans l'ostéoclastogénèse sont connus grâce à ces études chez des modèles animaux.

3.1 Modèles animaux de l'ostéopétrose

Tel que décrit précédemment, l'ostéopétrose est une maladie génétique caractérisée par une accumulation anormale de tissus osseux. Il en résulte une augmentation de la masse osseuse associée avec des déficits hématopoïétiques. La majorité des modèles animaux d'ostéopétrose ont été identifiés chez les souris, mais des phénotypes ostéopétroriques ont également été rapportés chez les rats, les lapins et les poulets (Marks SC Jr. 1973, Marks SC Jr. 1977, Lenhard S. *et al.* 1990, Kawaguchi N. *et al.* 2001). Seuls les modèles d'ostéopétrose chez la souris seront analysés dans les prochains paragraphes.

3.1.2 Mutants spontanés chez la souris

Quatre modèles spontanés d'ostéopétrose ont été identifiés chez la souris. Les gènes responsables de ces quatre phénotypes ont été identifiés et sont maintenant caractérisés, certains très récemment.

La souris *oc* (*osteosclerotic*) présente un phénotype ostéopétrotique dû à un défaut de l'activité de résorption des ostéoclastes (Seifert MF. *et al.* 1985). Une délétion a été identifiée chez la souris *oc/oc* au niveau du gène codant pour une des sous-unités (116 kD) de la pompe à protons H^+ -ATPase spécifique aux ostéoclastes (Li YP. *et al.* 1999). Cette mutation autosomale récessive induit l'absence totale de cette pompe à la membrane apicale de l'ostéoclaste. Un transfert de moelle osseuse permet une complémentation phénotypique de l'ostéopétrose chez la souris *oc/oc* (Seifert MF. *et al.* 1987). Il est à noter que plusieurs mutations ont été identifiées dans le gène codant pour l'homologue humain de cette enzyme chez divers patients ostéopétrotiques (Sobacchi C. *et al.* 2001).

La souris *mi* (*microphthalmia*) décrite en 1967 présente un phénotype ostéopétrotique ainsi qu'un phénotype de la coloration du pelage (Packer SO. 1967). Cette mutation, de type dominant négatif, affecte le gène codant pour le facteur de transcription MITF, une protéine à domaine bHLH (*basic helix-loop-helix*). Ce facteur de transcription forme des homodimères ou des hétérodimères avec les autres membres de la famille, TFE3, TFEB et TFEC. Chez la souris *mi/mi* on retrouve une abondance de précurseurs ostéoclastiques mononucléés. L'ostéopétrose est due à un défaut de la différenciation des ostéoclastes suggérant un rôle essentiel pour ce facteur de transcription à l'étape de fusion des précurseurs mononucléés (Thesingh CW. *et al.* 1985). De plus, il a été démontré que l'homodimère MITF lie la boîte E présente dans les promoteurs des gènes TRAP

et cathépsine K, deux protéines essentielles à l'activité résorptive des ostéoclastes. La souris *mi* présente également un défaut au niveau du pelage et des yeux. Ce phénotype sera abordé dans un chapitre ultérieur.

La souris *op* (*osteopetrotic*) décrite en 1982 présente un phénotype ostéopétrotique (Marks SC Jr. 1982). Ce phénotype est dû à une mutation récessive dans le gène codant pour le facteur de croissance M-CSF. Une insertion d'un seul nucléotide induit l'apparition d'un codon stop et la formation d'une protéine non fonctionnelle (Yoshida H. *et al.* 1990). L'absence de M-CSF induit un défaut au niveau de la survie et la prolifération des précurseurs ostéoclastiques. Le phénotype ostéopétrotique est corrigé en surexprimant chez les souris *op/op* la protéine Bcl-2, un facteur anti-apoptotique (Lagasse E. *et al.* 1997). Le facteur de croissance M-CSF est exprimé par les ostéoblastes. Par conséquent, contrairement à *oc* et *mi*, la mutation n'est pas intrinsèque aux cellules hématopoïétiques, mais affecte plutôt le microenvironnement entourant l'ostéoclaste. En effet, une transplantation de moelle osseuse, source de précurseurs ostéoclastiques, ne corrige pas le phénotype ostéopétrotique des souris *op/op* (Marks SC Jr. *et al.* 1984). Par contre, l'injection de M-CSF recombinant corrige le phénotype ostéopétrotique (Kodama H. *et al.* 1991). Une complémentation du phénotype a également été observée chez une lignée transgénique exprimant spécifiquement dans les ostéoblastes la forme soluble du gène M-CSF sous le contrôle du promoteur de l'ostéocalcine (Abboud SL. *et al.* 2002). Cette mutation n'induit pas une létalité complète à l'état homozygote et la compensation par d'autres facteurs

de croissance tels le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) semble améliorer le phénotype avec l'âge (Niida S. *et al.* 1999).

La souris *gl* (*grey-lethal*) présente une ostéopétrose récessive létale ainsi qu'un phénotype de la coloration du pelage. Étant le modèle d'étude principal de ce mémoire, ce phénotype sera abordé en détail dans une section ultérieure.

3.1.2 Mutants induits chez la souris

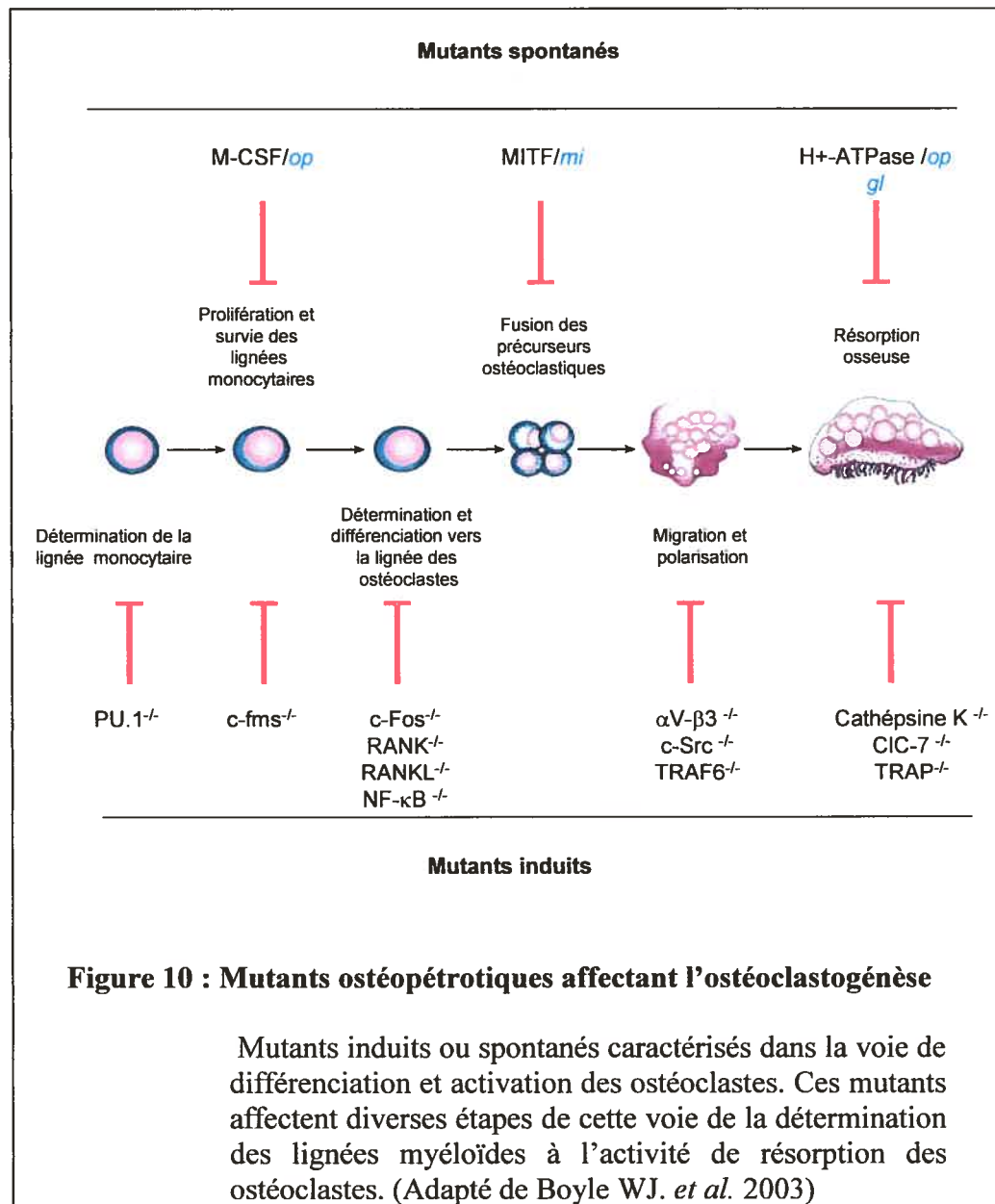
L'approche de l'ablation génique (*knock-out*) chez la souris a permis la création de plusieurs mutants ostéopétroriques. La caractérisation génétique et moléculaire de ces mutants a grandement contribué à l'avancement des connaissances sur la différenciation et l'activation des ostéoclastes.

L'inactivation du facteur de transcription PU.1 produit, chez la souris, une ostéopétrose sévère avec une létalité précoce (Tondravi MM. *et al.* 1997). Une complémentation phénotypique est obtenue par un transfert de moelle osseuse, indiquant un défaut intrinsèque aux précurseurs hématopoïétiques. PU.1 est exprimé au niveau des précurseurs myéloïdes plus particulièrement les précurseurs communs aux macrophages et aux ostéoclastes. Ainsi, on observe chez la souris PU.1^{-/-} l'absence complète d'ostéoclastes, mais également l'absence de macrophages.

L'inactivation du gène codant pour c-fms, le récepteur du M-CSF, entraîne une ostéopétrose (Dai XM. *et al.* 2002). Par contre, ce mutant présente un phénotype plus sévère que le mutant spontané *op/op* dû à l'absence de compensation par d'autres facteurs. De plus, un transfert de moelle osseuse permet de corriger le phénotype ostéopétritique observé chez les souris c-fms^{-/-}.

Quatre mutants produisent chez la souris un phénotype ostéopétritique où la détermination et/ou la différenciation vers la lignée des ostéoclastes est défectueuse. L'inactivation du gène codant pour RANKL ou RANK produit chez la souris une ostéopétrose sévère caractérisée par un blocage de la différenciation des ostéoclastes sans affecter les macrophages (Li J. *et al.* 2000, Kim N. *et al.* 2000). Seule l'inactivation du gène RANK peut être corrigée par un transfert de moelle osseuse.

L'inactivation du gène codant pour le facteur de transcription c-Fos induit une ostéopétrose létale (Grigoriadis AE. *et al.* 1994). On observe chez ce mutant une réduction du nombre de pré-ostéoclastes, conséquence directe d'un blocage de la voie de différenciation des ostéoclastes. Toutefois, la voie de différenciation des macrophages n'est pas atteinte.



Chez la souris, l'inactivation des deux sous-unités de NF-κB (p50 et p52) induit un phénotype ostéopétrique. Par contre, l'inactivation individuelle de chacun de ces gènes a un effet sur le système immunitaire et inflammatoire sans affecter l'homéostasie osseuse. La double inactivation (p50^{-/-} /p52^{-/-}) produit un phénotype ostéopétrique avec une réduction du nombre de pré-ostéoclastes et de

macrophages (Franzoso G. *et al.* 1997). Une complémentation phénotypique est obtenue par un transfert de moelle osseuse, indiquant un défaut intrinsèque aux précurseurs hématopoïétiques.

Plusieurs mutations résultent en un phénotype ostéopétrotique où on observe un défaut de migration et de polarisation de l'ostéoclaste. L'inactivation du gène codant pour la sous-unité $\beta 3$ du récepteur $\alpha V \beta 3$ de la vitronectine résulte en une diminution de la résorption osseuse. Les ostéoclastes présents dans les souris $\beta 3^{-/-}$ montrent des défauts majeurs du cytosquelette et sont incapables de s'attacher à la matrice osseuse (McHugh KP. *et al.* 2000). On peut également observer chez ces cellules l'absence d'anneau d'actine et un défaut au niveau de la formation de la bordure plissée. Un phénotype similaire est produit par l'inactivation des gènes TRAF6 et c-Src, tous deux codant pour des protéines impliquées dans la formation d'adhésion focale (Lomaga MA. *et al.* 2002, Soriano P. *et al.* 2001). L'inactivation des gènes codant pour PYK2 et la gelsoline entraînent un phénotype ostéopétrotique équivalent (Sanjay A. *et al.* 2001, Chellaiah M. *et al.* 2000). Dans tous les cas, les ostéoclastes présentent soit un défaut de migration et de polarisation soit un défaut de la bordure plissée apicale et sont incapables de résorber la matrice osseuse.

Un phénotype ostéopétrotique moins sévère est observé chez les souris où le gène Acp5, codant pour l'enzyme TRAP est inactivé (Hayman AR. *et al.* 1996). Chez

ces souris, on note une diminution du nombre des ostéoclastes même si le phénotype s'améliore avec le temps. Par contre, le double mutant $Acp5^{-/-}$ et $LAP^{-/-}$ (*lysosomal acid phosphatase*) présente un phénotype plus sévère indiquant une redondance fonctionnelle entre les deux enzymes (Suter A. *et al.* 2001).

Trois mutants ostéopétrotiques affectent la dernière étape de différenciation de l'ostéoclaste soit l'activité de résorption. L'inactivation du gène codant pour la cathépsine K mène à une ostéopétrose sévère (Gowen M. *et al.* 1999). L'inactivation de cette cystéine protéase chez la souris cause un remodelage osseux inadéquat et une ostéopétrose associée à une ostéosclérose due à une dégradation anormale de la matrice osseuse. L'inactivation de la sous-unité $\alpha 3$ de la pompe à proton entraîne un phénotype identique au mutant spontané *oc/oc* (Li YP. *et al.* 1999). L'inactivation du gène codant pour le canal de chlore, *ClC-7* entraîne une ostéopétrose récessive sévère (Kornak U. *et al.* 2001). Les ostéoclastes présents dans les souris *ClC-7^{-/-}* sont en nombre normal, présentent une bordure plissée, mais sont incapables de résorber adéquatement la matrice osseuse.

Parmi les divers mutants ostéopétrotiques murins décrits précédemment, seules les mutations affectant les gènes codant pour RANK, cathépsine K, *ClC-7*, H^+ -ATPase et *grey-lethal* ont été décrites comme associées aussi à des pathologies humaines.

4. La peau et la pigmentation

Chez les mammifères, la peau est un des plus grands organes de l'organisme en surface et en poids. La fonction principale de la peau est de séparer l'organisme de l'environnement extérieur. En plus d'être la première barrière, la peau permet, grâce à la transpiration, le maintien de la température corporelle. On retrouve dans les différentes couches de la peau des cellules spécialisées productrices de pigments qui permettent une protection contre les dommages produits par les rayons ultraviolets.

Chez la souris, la peau est constituée de deux couches distinctes: l'épiderme, la couche la plus superficielle, et le derme, qui repose sur le tissu sous-cutané (l'hypoderme) (Figure 11). L'hypoderme ne fait pas partie de la peau, mais demeure important, car il relie la peau aux structures sous-jacentes. Il est constitué de tissu conjonctif lâche comportant souvent des cellules adipeuses ainsi que des fibres qui assurent l'élasticité et le soutien aux couches adjacentes. Le derme est principalement composé d'un tissu conjonctif dense non orienté. Il possède beaucoup de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de neurofibres. Les récepteurs cutanés, les glandes et les follicules pileux se trouvent également dans le derme. L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé non vascularisé. L'épiderme est davantage sous-divisé en couches ou en strates: la couche basale (*BL : basal layer*), la couche des cellules à épines (*SL : spinous layer*), la couche granuleuse (*GL : granular layer*) et la couche cornée (*SC :*

stratum comeum) (Figure 11). C'est dans la couche basale que se produit la mitose des nouvelles cellules responsables de la croissance de l'épiderme. Les couches les plus superficielles sont de plus en plus kératinisées et de moins en moins viables. La couche cornée est constituée de cellules mortes entièrement kératinisées qui tombent continuellement. La majorité des cellules de l'épiderme sont des kératinocytes, mais on trouve également des mélanocytes, des cellules de Merkel et des cellules de Langerhans dispersés parmi les kératinocytes de la couche la plus profonde de l'épiderme.

Le poil, produit par le follicule pileux, est constitué de cellules fortement kératinisées. Le follicule pileux, formé par l'invagination de l'épiderme dans le derme, est une structure complexe composée de multiples couches concentriques de cellules épithéliales (Figure 11). Chaque poil se compose d'une moelle centrale (*médulla*), d'un cortex et d'une cuticule externe. Une structure spécialisée, la papille dermale (*dermal papilla*), formée à la base du follicule, est principalement constituée de cellules d'origine dermale et régule la succession des cycles de croissance du poil. Trois phases de croissance du poil ont été caractérisées : la phase anagène, croissance et pigmentation active, la phase catagène, quiescence, et la phase télogène, régression de la croissance.

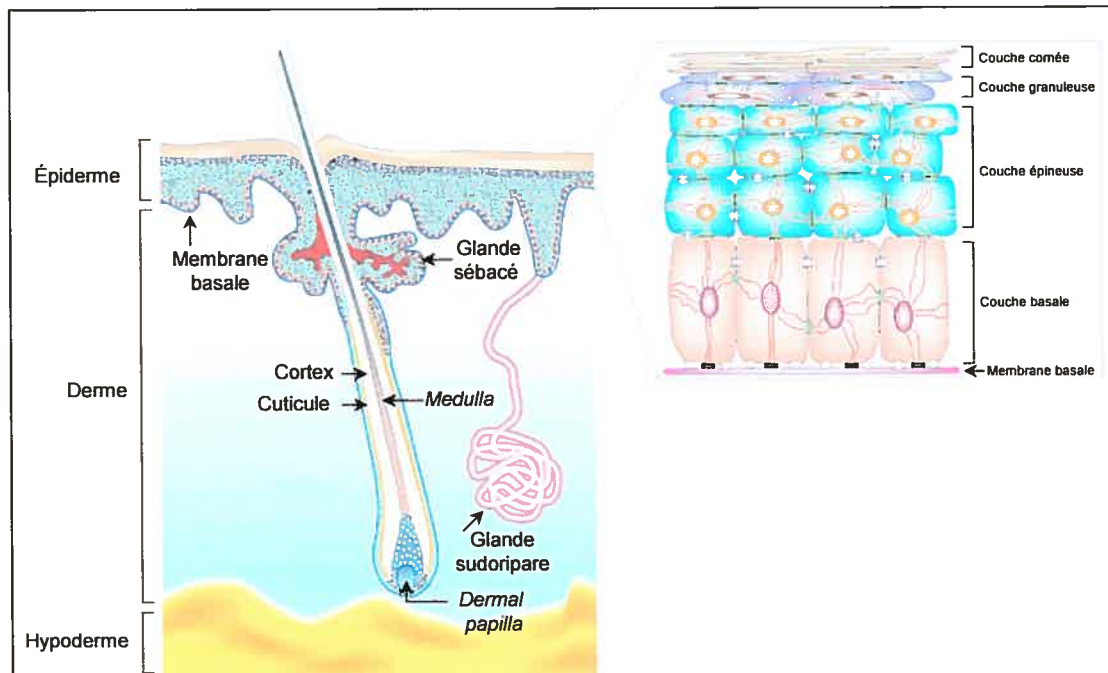


Figure 11 : Principales structures de la peau et du follicule pileux

Représentation schématique des principales structures de la peau. La peau est constituée de deux couches, l'épiderme et le derme. L'hypoderme ne fait pas partie de la peau, mais est important dans la structure et le maintien des couches sous adjacentes. L'épiderme est sous-divisé en strates : la couche basale, la couche des cellules à épines, la couche granuleuse et la couche cornée. Le follicule pileux est une structure composée de multiples couches concentriques de cellules épithéliales. Le poil se compose d'une moelle centrale (*médulla*), d'un cortex et d'une cuticule externe ainsi que de la papille dermale (*dermal papilla*) formée à la base du follicule. (Adapté de Fuchs E. *et al.* 2002)

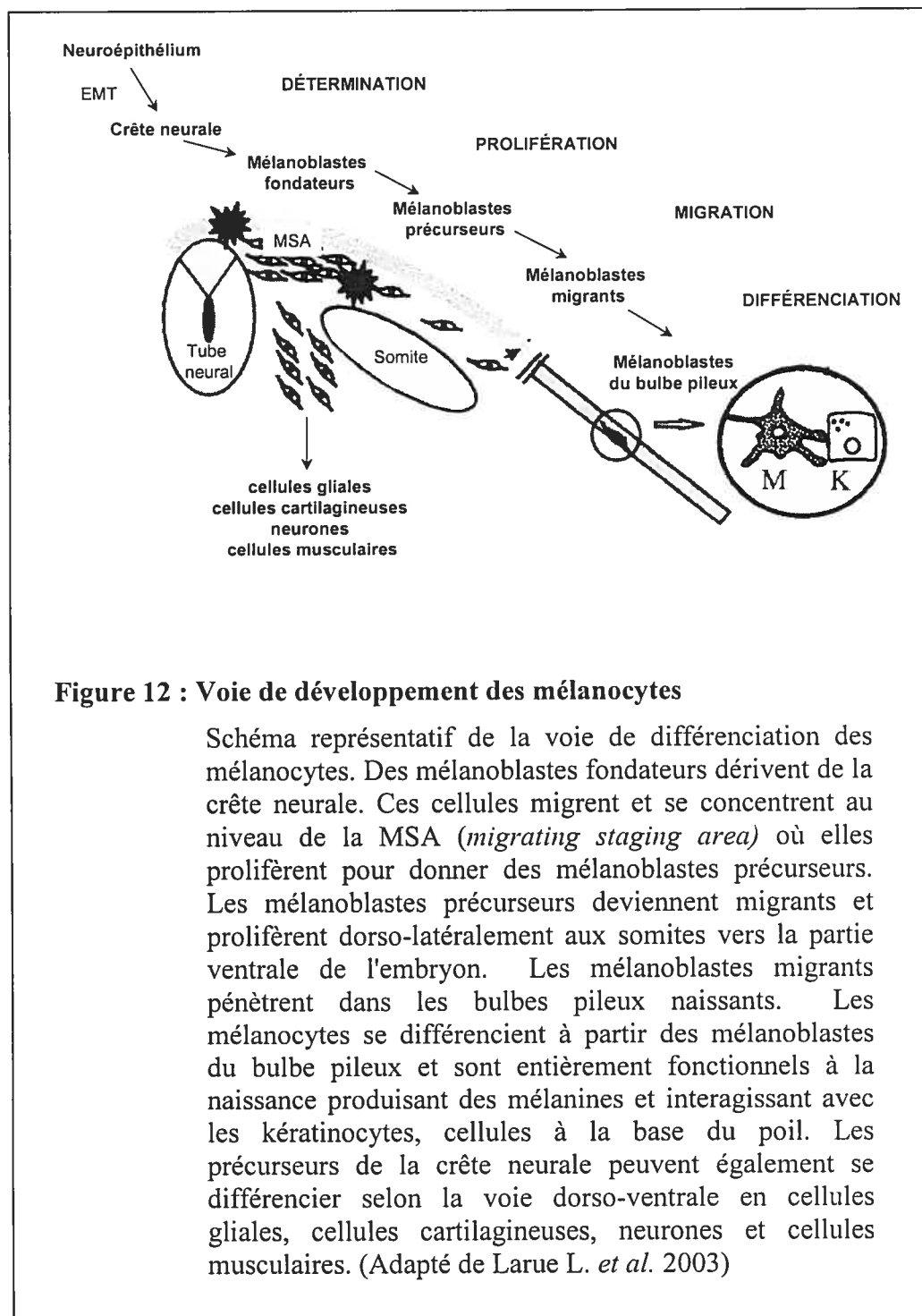
4.1 Mélanocytes et synthèse des pigments

Les kératinocytes sont le type cellulaire le plus abondant de l'épiderme. Ces cellules produisent la kératine, protéine qui confère une certaine rigidité aux couches de la peau. Les kératinocytes constituent également la majorité des cellules retrouvées dans le follicule pileux. Les kératinocytes sont incapables de synthétiser des pigments, mais retiennent le pigment produit par les mélanocytes. Les mélanocytes, moins abondants, sont localisés dans le follicule et dans la couche basale de l'épiderme. Ce sont des cellules ayant de longues projections dendritiques qui assurent la synthèse et la sécrétion de deux types de pigment : l'eumélanine de couleur brun/noir et la phéomélanine de couleur jaune/rouge.

4.1.1 Origine et différenciation des mélanocytes

La lignée mélanocytaire est établie à partir de précurseurs dérivés de la crête neurale pour produire des mélanocytes (Figure 12). Ces mêmes précurseurs peuvent également se différencier en cellules gliales, cellules cartilagineuses, neurones et cellules musculaires (Le Douarin NM. *et al.* 2003, Graham A. 2003). Chez la souris, il existe un nombre très restreint de mélanoblastes fondateurs (ou primaires) qui seraient déterminés sur l'axe dorso-latéral de l'animal. Les autres types cellulaires dérivés de la crête neurale seraient déterminés sur l'axe dorso-ventral. Les mélanoblastes fondateurs apparaissent au niveau des bords latéraux de la plaque neurale au moment de la fermeture du tube neural où les cellules subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Yamane T. *et al.*

2002). Après être déterminés les mélanoblastes fondateurs commencent à proliférer pour produire les mélanoblastes précurseurs (ou secondaires) et se



concentrent dans une zone particulière appelée MSA (*migrating staging area*). La MSA est située dans une zone acellulaire comprise entre la partie dorsale du somite, latérale du tube neural et ventrale de l'ectoderme (Mayer TC. 1973, Erickson CA. *et al.* 1983). À partir du jour E8.5, les mélanoblastes précurseurs deviennent migrants (ou tertiaires). Ils migrent et prolifèrent dorso-latéralement aux somites vers la partie ventrale de l'embryon. Les mélanoblastes tertiaires franchissent la lame basale et commencent à envahir l'épiderme à partir de E13 (Yoshida H. *et al.* 1996). Les mélanoblastes migrants pénètrent dans les bulbes pileux naissants à partir de E15. Ces mélanoblastes sont qualifiés de mélanoblastes du bulbe pileux (ou quaternaires). Les mélanocytes se différencient à partir des mélanoblastes quaternaires et sont entièrement fonctionnels à la naissance produisant des mélanines et interagissant avec les cellules de la base du poil. On retrouve des cellules pigmentées dans les yeux au niveau de l'épithélium pigmenté de la rétine, mais contrairement aux mélanocytes de la peau, ces cellules, qui se différencient à partir du tube neural, ne prolifèrent pas et ne sécrètent pas leurs granules pigmentées (Dupin E. *et al.* 2003).

Plusieurs signaux du microenvironnement régulent l'induction, la détermination, la migration, la prolifération et la survie des mélanoblastes (Figure 13) (Dorsky RI. *et al.* 2000). La signalisation induite par la famille des protéines Wnt joue un rôle important dans la différenciation des mélanocytes (Patapoutian A. *et al.* 2000). La liaison de Wnt à son récepteur Frizzled induit l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine suivie de sa translocation dans le noyau. La β -caténine forme un

complexe avec LEF-1/TCF (*lymphoid-enhancing factor 1 / T-cell factor*) et permet l'activation des gènes qui sont essentiels à la prolifération et la différenciation des mélanoblastes fondateurs (Cadigan KM. *et al.* 1997). Un de ces gènes cibles est le facteur de transcription MITF (Takeda K. *et al.* 2000). Ce facteur induit à son tour l'expression de gènes clefs qui sont essentiels à la différenciation des mélanocytes. La souris *mi* (*microphthalmia*) présente une mutation de type dominant négatif qui affecte le gène codant pour le facteur de transcription MITF. Outre le phénotype ostéopétritique, cette souris est dépourvue de pigmentation au niveau du pelage dû à l'absence de mélanocytes matures.

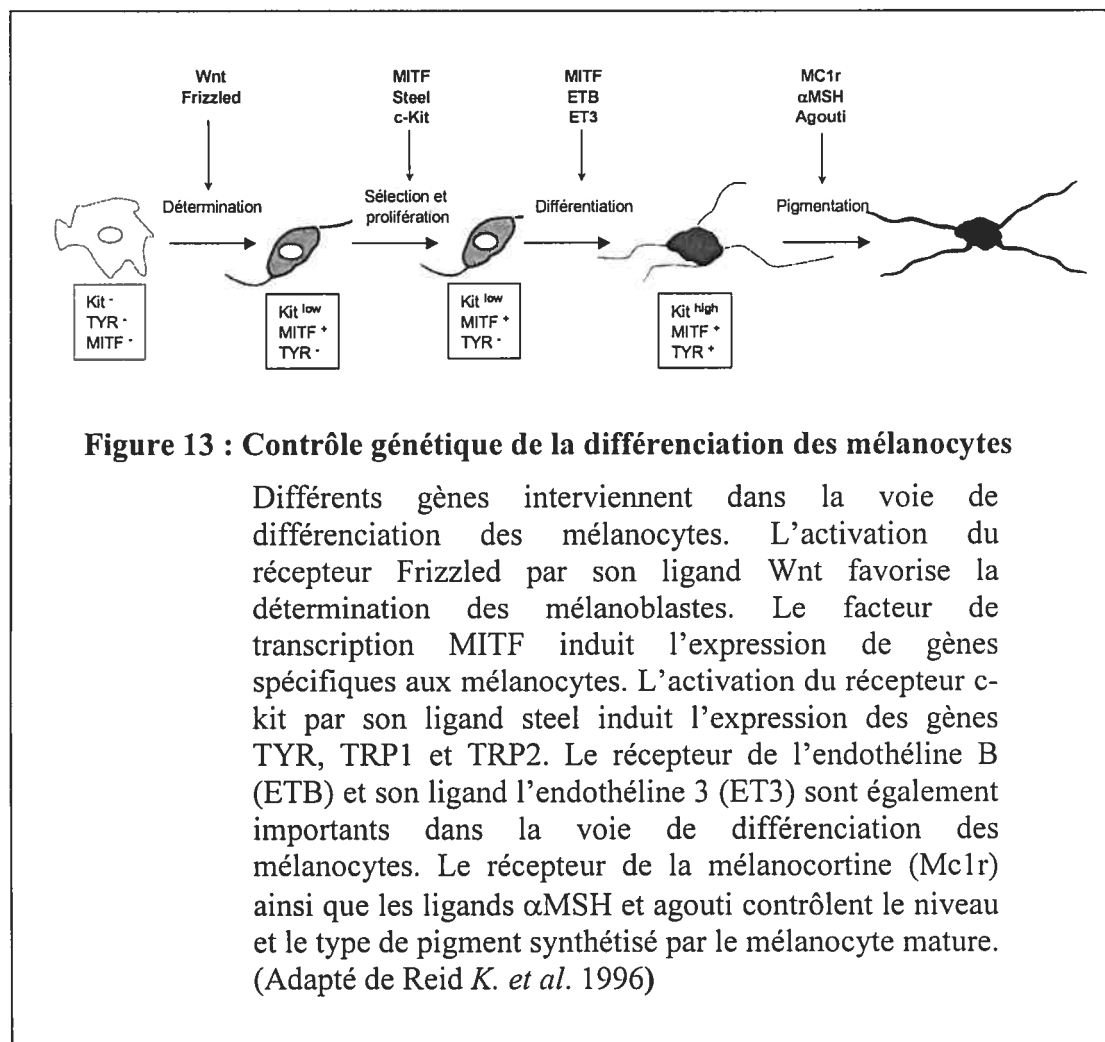
Le récepteur à tyrosine kinase c-kit et son ligand steel (SLF) sont également essentiels au développement des mélanocytes. L'inactivation de l'un de ces deux facteurs induit donc un défaut de la coloration du pelage. Des mutations ont été identifiées dans les gènes c-kit et SLF chez les souris *dominant white spotting* (*W*) et *steel* (*Sl*) où on a démontré un défaut de la différenciation et de migration des mélanoblastes (Chabot B. *et al.* 1988, Geissler EN. *et al.* 1988, Copeland NG. *et al.* 1990, Zsebo KM. *et al.* 1990). Le récepteur de l'endothéline B (ETB) et son ligand l'endothéline 3 (ET3) sont également importants dans la voie de différenciation des mélanocytes. Des mutations ont été identifiées dans ces deux gènes chez les souris *lethal spotting* (*ls*) et *piebald-lethal* (*s^l*) ayant un défaut de pigmentation du pelage (Baynash AG. *et al.* 1994, Hosoda K. *et al.* 1994).

La régulation de gènes plus spécifiques à la synthèse des mélanines est importante aux étapes plus tardives de la différenciation ainsi qu'à l'étape d'activation des mélanocytes (Figure 13). Les gènes codant pour la tyrosinase, la TRP1 (*tyrosinase related protein 1*) et la TRP2 (*tyrosinase related protein 2*) sont essentiels à l'étape terminale de différenciation des mélanoblastes en mélanocytes matures (Guyonneau L. *et al.* 2004, Jackson IJ. *et al.* 1990). La souris *albino* (TYR^c) est complètement dépourvue de pigment au niveau du pelage et des yeux (Hearing VJ. *et al.* 1973). Chez ces souris, diverses mutations ont été identifiées dans le gène de la tyrosinase, toutes menant à l'inactivation de l'enzyme et à l'absence de mélanine au niveau des mélanocytes. L'inactivation des protéines TRP1 et TRP2 génère des phénotypes moins sévères de la coloration du pelage chez la souris. De plus, le récepteur des mélanocortines (MC1r) et son ligand, la mélanocortine (α MSH), sont d'importants régulateurs de l'activité de ces métalloenzymes. Ainsi, des mutations affectant ces protéines induisent également des défauts de coloration du pelage chez la souris (Smart JL. *et al.* 2003).

4.1.2 Fonction des mélanocytes

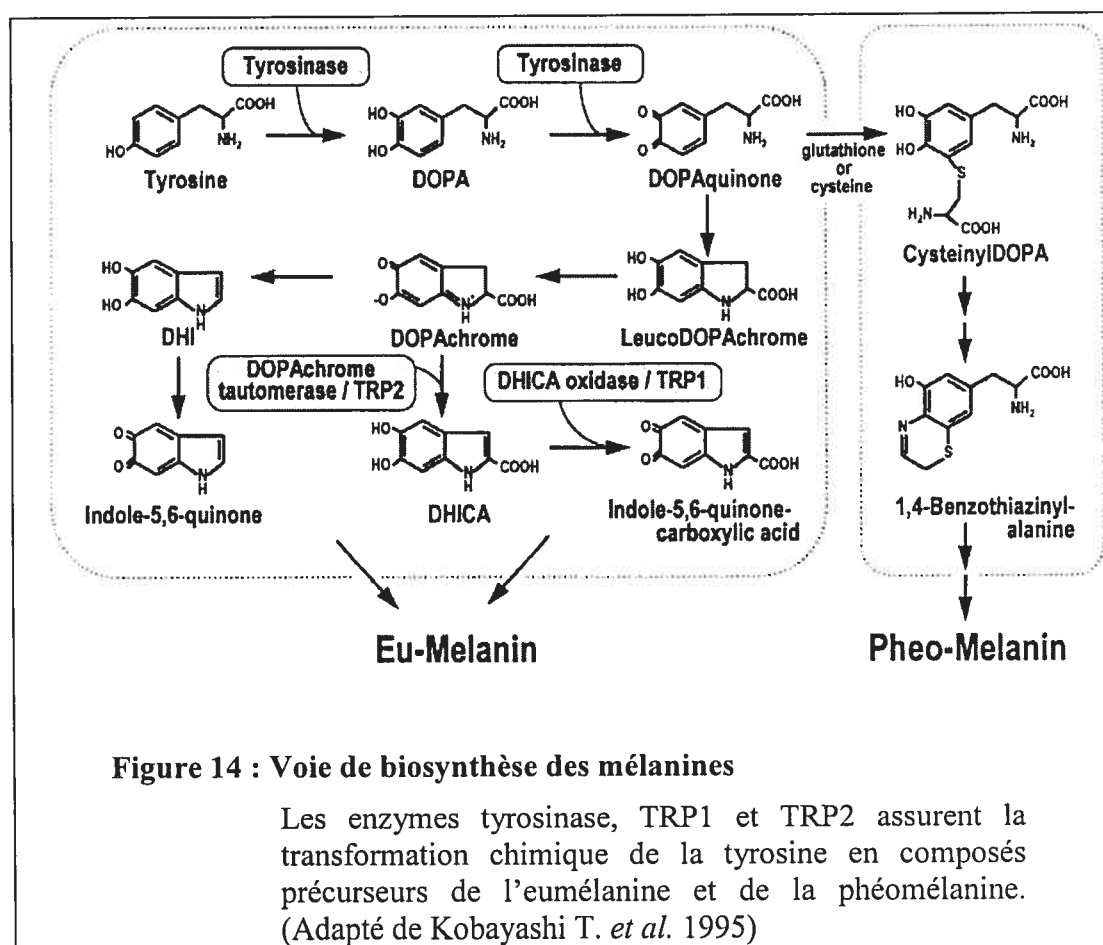
La fonction principale des mélanocytes résidants de la peau et des follicules est de synthétiser et de sécréter des granules de mélanine aux kératinocytes. Ainsi, chaque mélanocyte interagit avec plusieurs kératinocytes par des projections dendritiques. Outre le rôle de protection contre les rayons ultraviolets, la présence

de ces granules dans le kératinocyte permet une pigmentation de la peau ainsi que du poil.



Les mélanocytes produisent deux pigments soit l'eumélanine (pigment noir) et la phéomélanine (pigment jaune) (Kobayashi T *et al.* 1995). Ces deux pigments sont synthétisés à partir d'un même acide aminé, la tyrosine (Figure 14). Dans cette voie de synthèse, l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-alanine) est contrôlée par la tyrosinase, une métalloenzyme spécifique aux

mélanocytes. Diverses réactions d'oxydation du DOPA où interviennent les enzymes TYR, TRP1 et TRP2 permettront alors la synthèse d'eumélanine. Par contre, l'ajout d'un groupement thiol à la DOPAquinone, un dérivé oxydé de la DOPA, produit la cysténylDOPA nécessaire à la phéomélanogénèse (Barber JI. *et al.* 1985). La synthèse de chacun de ces pigments serait contrôlée par le niveau d'expression des enzymes de cette voie et ce, plus particulièrement au niveau de la tyrosinase, l'enzyme limitante de cette voie de biosynthèse. Ainsi, en présence d'un niveau élevé de tyrosinase, l'eumélanine est synthétisée par défaut, tandis qu'un niveau faible favorise alors la voie de synthèse de la phéomélanine.



La biosynthèse de ces pigments se fait dans une organelle spécialisée du mélanocyte, le mélanosome. Ces vésicules sont apparentées aux lysosomes/endosomes de par leur pH acide et leur composition protéique. La biogenèse des mélanosomes peut être sous-divisée en quatre classes distinctes (Seiji M. *et al.* 1963). Les mélanosomes de type I ou prémélanosomes ont une structure vésiculaire circulaire simple ayant de multiples replis membranaires mais sont dépourvus de mélanine. Les mélanosomes de type II ont une structure ovale où se forment des striations internes. La mélanine synthétisée dans le mélanosome de type III s'accumule sur les striations jusqu'à ce que les filaments de mélanine saturerent entièrement la vésicule formant un mélanosome de type IV. Il est à noter qu'il existe une différence morphologique entre les mélanosomes contenant de l'eumélanine et ceux contenant de la phéomélanine. En effet, l'eumélanogénèse produit un mélanosome de forme plutôt ellipsoïdale contenant des filaments organisés tandis que la phéomélanogénèse produit un mélanosome de forme sphérique contenant des granules pigmentées (Jimbow K. *et al.* 2000, Raposo G. *et al.* 2001).

4.1.3 Contrôle de la pigmentation

La couleur du pelage chez la souris est déterminée par les proportions relatives de deux types de pigments dans le poil : l'eumélanine et la phéomélanine (Furumura M. *et al.* 1998). Le ratio de la synthèse de ces deux pigments est sous le contrôle de deux loci (Figure 15) : *agouti* et *extension* qui encodent respectivement la protéine agouti (*ASP* : *agouti signal protein*) et le récepteur de la mélanocortine (*MC1r* : *melanocyte stimulating hormone receptor 1*) (Kobayashi T. *et al.* 1995).

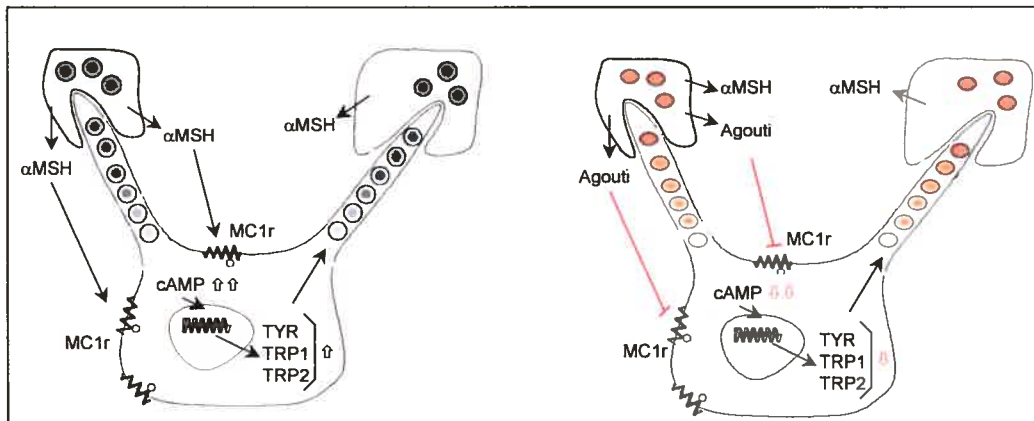


Figure 15 : Contrôle de la synthèse des mélanines

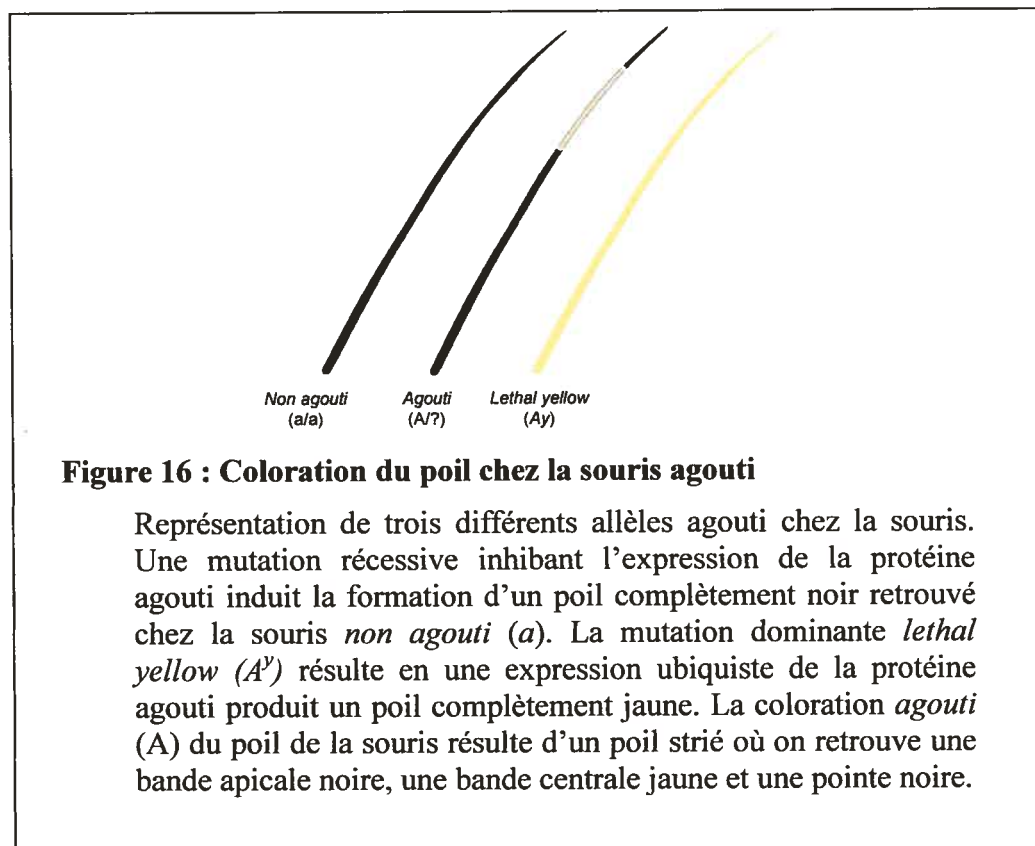
Schéma représentant le mécanisme de contrôle de la biosynthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine. L'activation du récepteur de la mélanocortine (MC1R) par la α MSH induit l'augmentation de l'expression de la tyrosine, de la TRP1 et de la TRP2. L'augmentation de ces enzymes au niveau des mélanocytes favorise la synthèse d'eumélanine. Les kératinocytes expriment la protéine agouti, un antagoniste du récepteur de la mélanocortine. Ainsi, la liaison de la protéine agouti sur MC1r induit une diminution des niveaux d'expression des enzymes nécessaires à la mélanogénèse. Cet état favorise la synthèse de la phéomélanine.

La mélanocortine (α MSH) résulte d'un clivage protéolytique de son précurseur, la pro-opiomélanocortine (POMC). La glande hypophysaire est le site majeur de synthèse et de sécrétion de cette hormone, mais ce précurseur est également synthétisé au niveau de la peau par les kératinocytes et même par les mélanocytes (Tsatsmali M. *et al.* 2002). Le récepteur de α MSH, MC1r, est exprimé au niveau des mélanocytes folliculaires (Lu D. *et al.* 1994). L'activation de ce récepteur couplé aux protéines G par son ligand induit l'activation de l'adénylate cyclase suivi d'une augmentation des niveaux de AMPc intracellulaire. Ceci induit la synthèse de novo ainsi que l'activation de l'enzyme tyrosinase et la production d'eumélanine (Kobayashi T. *et al.* 1995).

Au niveau du follicule, la protéine agouti, produite par les cellules de la papille dermale, contrôle de manière paracrine la production des deux pigments par les mélanocytes folliculaires (Bultman SJ. *et al.* 1992., Miller MW. *et al.* 1993) Cette protéine est un antagoniste de la mélanocortine et se lie également au récepteur MC1r. Ainsi, la liaison de la protéine agouti sur le récepteur de la mélanocortine inactive l'adénylate cyclase et induit une diminution de l'AMPc. Cet antagoniste entraîne donc une diminution considérable de l'expression de la tyrosinase, de TRP1 et TRP2, favorisant la phéomélanogénèse.

La coloration *agouti* du pelage de la souris résulte d'un poil strié où on retrouve une bande apicale "noire", une bande centrale "jaune" et une extrémité "noire"

(Figure 16). Cette apparence striée du poil provient d'une synthèse et d'une sécrétion cyclique d'eumélanine et de phéomélanine par les mélanocytes. L'expression transitoire de la protéine ASP durant la croissance du poil assure la formation d'un poil strié. Plusieurs mutations dans le gène codant pour la protéine agouti produisent un phénotype de coloration du pelage chez la souris. La mutation dominante *lethal yellow* (*A^y*) induit une expression ubiquiste de la protéine agouti et induit la formation d'un poil complètement jaune (Duhl DM. *et al.* 1994). À l'opposé, la mutation *non agouti* (*a*) au locus agouti entraîne à l'état récessif l'absence totale de la protéine agouti. Puisque la sécrétion de mélanocortine n'est pas altérée par cette mutation on obtient alors la formation de poil complètement noir (Kobayashi T. *et al.* 1995).



5. Phénotype ostéopétritique et défaut de coloration chez la souris

Il existe aujourd'hui plusieurs modèles murins d'ostéopétrose qui résultent de mutations spontanées ou induites. De même, il existe un très grand nombre de modèles murins présentant divers défauts de la coloration du poil. Par contre, les souris *mi/mi* (*microphthalmia*) et *gl* (*grey-lethal*) se retrouvent dans une classe particulière démontrant à la fois un défaut de la couleur du pelage et de l'homéostasie osseuse.

La souris *mi* (*microphthalmia*) est caractérisée par une mutation de type dominant négatif dans le facteur de transcription MITF (Packer SO. 1967). Or, ce facteur de transcription, exprimé dans les ostéoclastes et les mélanocytes, semble essentiel à la différenciation de ces deux types cellulaires.

MITF joue un rôle essentiel à l'étape de fusion des précurseurs mononucléés puisque la souris *mi/mi* est dépourvue d'ostéoclastes matures multinucléés (Thesingh CW. *et al.* 1985). De plus, dans les ostéoclastes, ce facteur de transcription est essentiel pour l'activation de la transcription de gènes essentiels, tels que l'enzyme TRAP et la Cathépsine K, requis pour une résorption active de la matrice osseuse.

MITF est également essentiel à la différenciation des mélanoblastes. Ce facteur de transcription induit l'expression de gènes clefs qui sont essentiels aux mélanocytes

matures (Takeda K. *et al.* 2000). La souris *mi/mi*, outre le phénotype ostéopétrotique, est dépourvue de pigmentation au niveau du pelage et des yeux dû à l'absence de mélanocytes matures.

La souris *gl* (*grey-lethal*) présente également un phénotype ostéopétrotique et un défaut de la coloration du pelage, mais ces derniers diffèrent de la souris *mi/mi*, puisque des ostéoclastes et des mélanocytes matures sont présents dans la souris *gl*. Étant le modèle d'étude principal de ce mémoire, ces phénotypes seront abordés en détail dans une section ultérieure (Chapitre 1 : Section 6).

6. La souris *grey-lethal*

La souris *grey-lethal* (*gl*), mutant spontané ostéopétrotique, est le modèle d'étude principal de ce mémoire. La souris *gl* représente un modèle idéal pour l'étude de l'ostéopétrose récessive maligne, car son phénotype se rapproche de la maladie infantile humaine.

Cette souris ostéopétrotique fut décrite pour la première fois en 1935 par Grüneberg (Grüneberg H. 1935, Grüneberg, H. 1936, Grüneberg, H. 1938). Ce mutant est apparu spontanément dans une colonie de souris et a été identifié par la couleur grise de son pelage comparativement aux souris sauvages qui sont agouti (Vacher J. et Bernard H. 1999). La mutation *gl* est létale à l'état homozygote, ainsi le maintien de la mutation se fait à l'état hétérozygote. De plus, la mutation récessive viable *downless* (*dl*) a été introduite afin de générer une souche *GL/Le dlJ +/+ gl*, permettant de suivre la transmission de l'allèle *gl* dans la progéniture. Cette lignée est maintenue à l'état hétérozygote par croisement frère/sœur (intercross) (Vacher J. et Bernard H. 1999).

6.1 Phénotype de la souris *gl*

La souris *gl* est caractérisée par deux phénotypes majeurs : un phénotype ostéopétrotique et un phénotype de coloration du pelage (Figure 17).

6.1.1 Phénotype squelettique

La souris *gl* développe une ostéopétrose autosomale récessive très sévère qui se manifeste par un retard de croissance, une cavité médullaire réduite dans les os longs et l'absence d'éruption des dents (Figure 17B). Le phénotype ostéopétritique est clairement démontré sur des coupes histologiques effectuées sur les os longs de la souris *gl/gl* (Figure 17C). Comparativement à une souris sauvage, on note sur les coupes histologiques de la souris *gl* la réduction de la cavité médullaire qui résulte en une quasi-absence de la moelle osseuse. De plus, la densité osseuse accrue affecte également la forme de l'os et ce, particulièrement au niveau de l'épiphyse et de la plaque de croissance (Figure 17C). L'absence de moelle osseuse observée chez la souris *gl/gl* n'induit pas une splénomégalie due à une hématopoïèse extramédullaire. Par contre, certaines populations hématopoïétiques sont affectées, notamment au niveau des cellules B qui sont diminuées (Vacher J., résultats non publiés). Ce défaut pourrait ne pas être directement lié à la mutation *gl*, mais pourrait s'expliquer par un effet secondaire dû à la réduction de la moelle osseuse. Les souris portant la mutation à l'état homozygote meurent à environ trois semaines après la naissance (Grüneberg, H. 1938, Hollinshead MB. *et al.* 1975). La cause de la mort n'a pas été établie, bien que différentes hypothèses peuvent être émises à ce sujet. Les souris *gl/gl* présentent une susceptibilité accrue aux infections, une compression des organes vitaux ainsi qu'une difficulté à se nourrir due à l'absence d'éruption des dents. Or, aucune prolongation de la durée de vie n'a pu être établie chez les souris *gl/gl*

même lorsqu'elles sont maintenues dans un environnement exempt de pathogènes et avec une diète liquide, excluant donc ces deux possibilités.

6.1.2 Phénotype de couleur du pelage

La modification de la coloration du pelage est un autre phénotype majeur de la souris *grey-lethal*. En effet, la souris présente, à l'état homozygote pour la mutation *gl*, une coloration grise du pelage se distinguant des souris sauvages ou hétérozygotes pour l'allèle *gl* qui sont agouti (Figure 17A). Basé sur le mécanisme de pigmentation du poil chez une souris agouti, ce phénotype implique un défaut spécifique au niveau de la synthèse et/ou de la sécrétion du pigment jaune. Ainsi, la couleur grise de la souris *gl/gl* ne peut se manifester que si la souris est maintenue sur un fond génétique agouti, la souris homozygote *gl/gl* serait noire sur un fond génétique C57BL/6J (*aa*, noir), démontrant encore que le défaut affecte seulement la pigmentation jaune.

6.2 Caractérisation de la souris *gl*

Des études au niveau cellulaire et moléculaire ont été effectuées afin de comprendre les divers phénotypes observés chez la souris *gl*. Ces études ont permis de caractériser les ostéoclastes et les mélanocytes et de comprendre les phénotypes observés chez la souris *gl* au niveau osseux et au niveau de la coloration du poil.

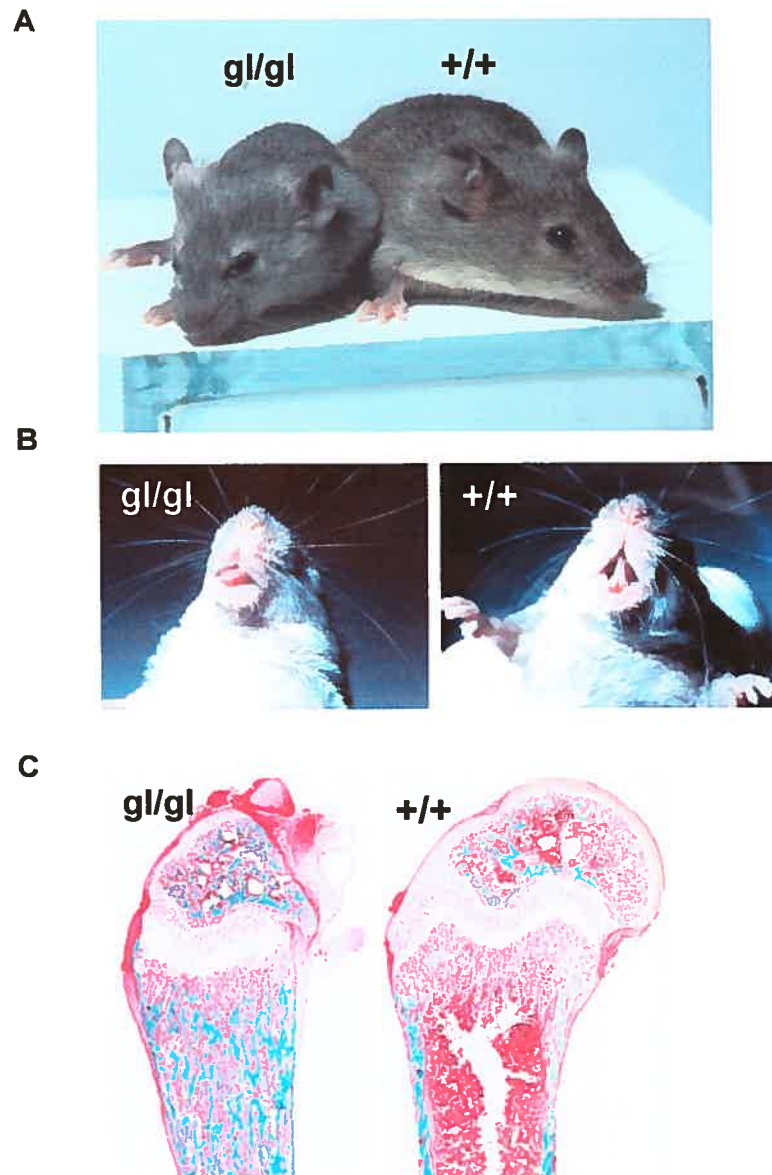


Figure 17 : Phénotypes de la souris grey-lethal (*gl*)

- A) La souris grey-lethal (*gl*) présente un phénotype de la couleur du pelage : la souris *gl/gl* est grise, la souris sauvage *+/+* est agouti.
- B) Absence de l'éruption des dents chez la souris *gl/gl* due à l'ostéopétrose sévère de cette de souris comparativement à la souris sauvage *+/+*.
- C) Histologie des os longs démontrant le phénotype ostéopétrotique : absence de la cavité médullaire et déformation de l'épiphyse de l'os *gl/gl* comparativement à l'os *+/+*.

6.2.1 Les ostéoclastes

Chez la souris grey-lethal, les premières études, au niveau osseux, ont été des essais de complémentation par transplantation de moelle osseuse (Walker DG. 1975). Ces essais ont démontré que la transplantation de cellules de moelle osseuse ou de rate de souris sauvages dans les souris *gl* irradiées peut corriger l'ostéopétrose. De plus, le transfert des cellules de la rate d'une souris *gl* induit également un phénotype ostéopétrotique chez les souris réceptrices sauvages irradiées (Walker DG. 1975). Ces études permettent donc d'associer l'ostéopétrose observée chez la souris *gl* à un défaut intrinsèque aux cellules hématopoïétiques d'où proviennent les précurseurs des ostéoclastes, excluant un défaut de l'environnement cellulaire.

Plus récemment, notre laboratoire a entrepris d'analyser le défaut cellulaire des ostéoclastes et ce plus particulièrement pour la souris *gl*. Les premières études suggèrent que l'ostéopétrose associée à la souris *gl* est une ostéopétrose fonctionnelle due à un défaut de résorption, sans que la voie de différenciation des ostéoclastes soit affectée. En effet, une coloration TRAP a permis de révéler la présence spécifique d'ostéoclastes sur des coupes d'os longs de la souris *gl*. Cette observation permet également de confirmer que les signaux de prolifération et de différenciation provenant des cellules stromales/ostéoblastes ne sont pas affectés chez la souris *gl*. De plus, une quantification des cellules TRAP positives révèle une augmentation de plus de 20% de la population ostéoclastique observée sur des

coupes de souris *gl/gl* comparativement aux coupes contrôles de souris sauvages (Rajapurohitam V. *et al.* 2001). Des études de résorption *in vitro* (*pit assay*) démontrent la faible capacité de résorption des ostéoclastes *gl*, suggérant ainsi qu'un mécanisme compensatoire induit la différenciation des ostéoclastes augmentant ainsi leur nombre dans le tissu osseux.

Des analyses de microscopie électronique ont permis de confirmer au niveau cellulaire que les ostéoclastes *gl* présentaient des anomalies structurales (Figure 18A). Les ostéoclastes *gl* sont multinucléés, sont présents et fixés à la surface de l'os par leurs zones d'attachements. Par contre, comparativement aux ostéoclastes observés sur des coupes d'os de souris sauvages, les ostéoclastes *gl* montrent un très faible développement de la bordure plissée apicale. Cette structure est essentielle à la résorption osseuse (Chapitre 1 : section 2.2.2).

De plus, des études d'immunofluorescence sur des ostéoclastes actifs de souris *gl* cultivés sur de la dentine démontrent une désorganisation du cytosquelette qui se manifeste par un défaut de la formation de l'anneau d'actine (Figure 18B). L'absence chez les ostéoclastes *gl* de la bordure plissée ainsi que de l'anneau d'actine pourrait expliquer le phénotype osseux observé chez la souris *grey-lethal* puisque ces structures sont requises pour la résorption efficace de la matrice osseuse.

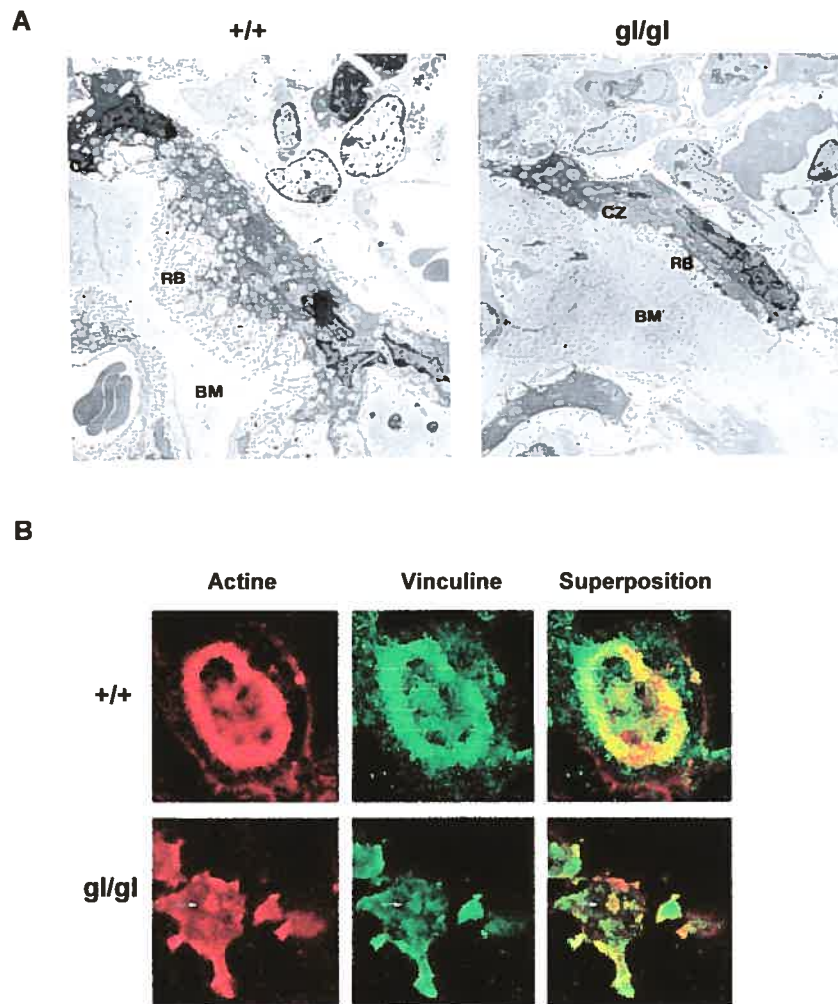


Figure 18: Caractérisation des ostéoclastes *gl*

- A) Ultrastructure des ostéoclastes *in vivo* par microscopie électronique. On note la présence de la bordure plissée (RB) et de la zone d'attachement (CZ) de l'ostéoclaste sauvage *+/+* lorsqu'il résorbe la matrice osseuse (BM). Les ostéoclastes sont présents dans les os *gl/gi* mais la bordure plissée (RB) est sous développée.
- B) Immunofluorescence sur des ostéoclastes primaires cultivés sur de la dentine. Désorganisation du cytosquelette de l'ostéoclaste *gl*: absence d'anneau d'actine, mauvaise localisation de l'actine (rouge) et de la vinculine (vert) comparativement à l'ostéoclaste sauvage. (Adapté de Rajapurohitam V. *et al.* 2001).

6.2.2 Les mélanocytes

Peu de choses sont connues sur les mécanismes de synthèse/sécrétion de mélanine par les mélanocytes chez la souris *gl*. Des analyses microscopiques effectuées par Grünberg en 1935 sur des follicules des souris *gl* ont démontré que le pigment jaune (phéomélanine) et le pigment noir (eumélanine) sont synthétisés, mais que la distribution du pigment jaune semble altérée (Grüneberg, H. 1935). En effet, le pigment jaune forme des agrégats au niveau de la base du poil et n'est pas incorporé dans les cellules médullaires qui composent le poil. Les mélanocytes *gl* sont donc capables de produire les deux pigments, mais présentent un défaut de transport du pigment jaune vers les kératinocytes. Ainsi, ce défaut se traduit, sur un fond génétique agouti, par la formation d'un poil où la bande centrale est dépourvue de pigment jaune produisant une coloration grise du pelage de la souris *gl*.

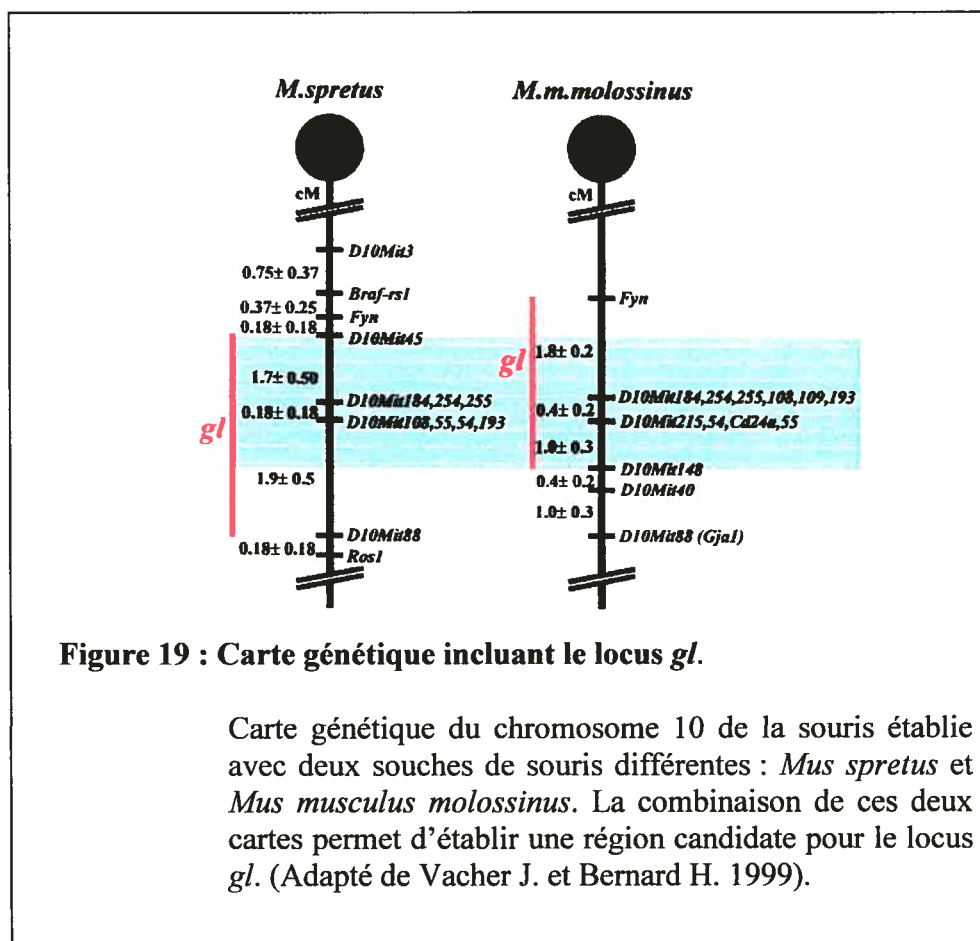
Les analyses de complémentation fonctionnelle abordées dans ce mémoire permettront de mieux comprendre les mécanismes de synthèse/sécrétion des mélanines, principalement de la phéomélanine, au niveau des mélanocytes de la souris *grey-lethal*.

6.3 Caractérisation génétique de la souris *gl*

Afin d'identifier et de caractériser le gène responsable de la mutation *grey-lethal*, une approche de clonage positionnel fut mise en œuvre dans le laboratoire. Cette stratégie utilisée lorsqu'il n'existe pas de gène candidat permet donc d'identifier un gène d'intérêt à partir de sa localisation chromosomique. Une cartographie fine de la région d'intérêt permet d'identifier des gènes candidats qui peuvent être caractérisés par la suite.

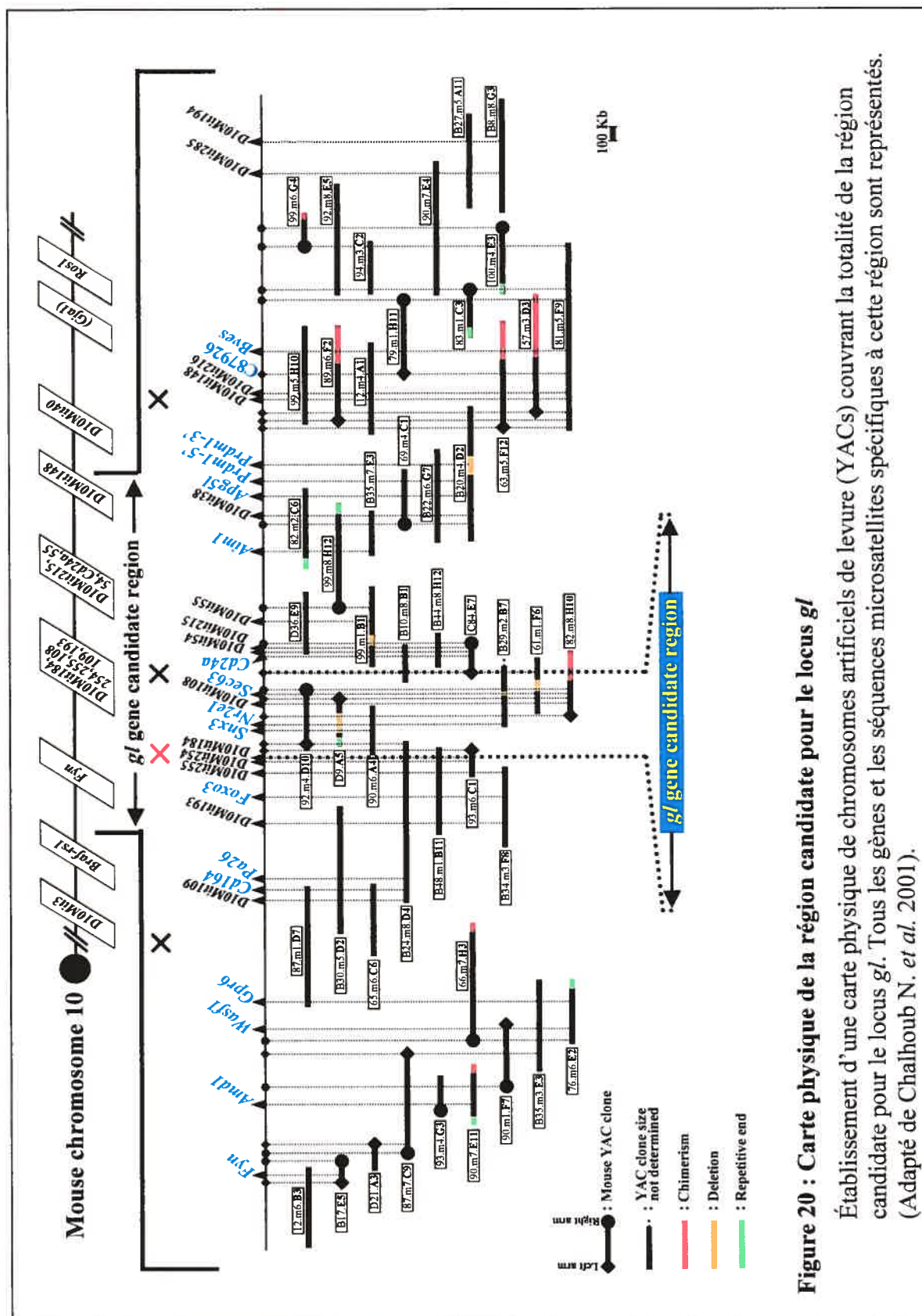
6.3.1 Localisation génétique

Des études de ségrégation, effectuées lors des croisements de souris *GL/Le dlJ +/+* *gl*, ont permis de localiser le gène *gl*. Cette approche a permis de définir un locus candidat dans la région proximale du centromère sur le chromosome 10 de la souris. De nouveaux croisements en retour effectués au laboratoire entre la souris *gl* hétérozygote et deux souches de souris sauvages (*Mus spretus* et *Mus musculus molossinus*) ont permis de raffiner la localisation du locus *gl* (Vacher J. et Bernard H. 1999). Deux cartes génétiques ont été établies et la combinaison des régions établies a permis de définir une nouvelle région candidate pour la localisation du locus *gl*. Cette région, couvrant 2 cM, est localisée entre le gène *Fyn* et le marqueur microsatellite *D10Mit148* (Figure 19) (Vacher J. et Bernard H. 1999).



6.3.2 Localisation physique

Une des étapes majeures du clonage positionnel est l'établissement d'une carte physique et transcriptionnelle de la région génétique candidate. Ainsi, diverses banques de chromosomes artificiels de levure (YACs) ont été criblées afin de générer une carte physique de l'intervalle génétique préalablement identifié (Figure 20) (Chalhoub N. *et al.* 2001). De plus, le séquençage des extrémités des clones YACs utilisés pour générer la carte physique a permis d'identifier de



nouveaux marqueurs spécifiques qui peuvent être utilisés pour délimiter une région candidate pour le locus *gl*. Les résultats combinés de la carte génétique, de la carte physique de YACs ont permis de définir une nouvelle région candidate d'environ 1000 Kb pour la localisation du locus *gl* (Chalhoub N. *et al.* 2001).

Afin de raffiner la carte physique couvrant le locus *gl*, une carte physique de chromosomes artificiels de bactérie (BACs) a été mise en œuvre (Chalhoub N. *et al.* 2003). Basé sur la carte de BACs, cet intervalle fut ainsi réduit, grâce à de nouveaux marqueurs polymorphiques dérivés des extrémités des BACs, à une région physique d'environ 500 Kb incluant le gène *gl* (Figure 21A).

6.4 Identification et caractérisation du gène *gl*

Ce nouvel intervalle non-recombinant a donc été couvert en totalité par le contig de BACs et la localisation des gènes et ESTs a été réalisée dans l'intervalle (Figure 21A). Certains de ces gènes et transcrits représentaient des candidats potentiels pour le gène *gl*.

6.4.1 Complémentation fonctionnelle par transgénèse

Pour définir le meilleur candidat pour le gène *gl*, des souris transgéniques ont été générées avec des BACs afin d'obtenir une complémentation fonctionnelle *in vivo*. Suite à des analyses phénotypiques et histologiques, une lignée transgénique ayant

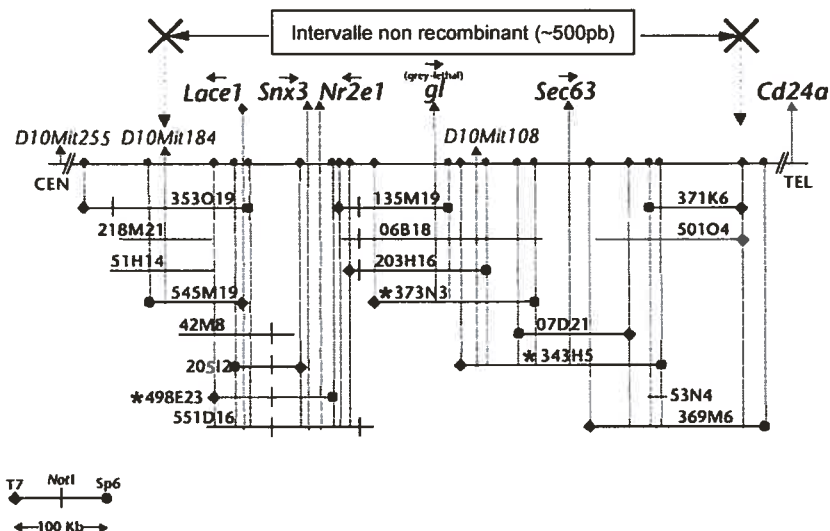
intégré un clone BAC de 180 Kb a démontré une complémentation du phénotype ostéopérotique (Figure 21B) et de la coloration du poil (Chalhoub N. *et al.* 2003). L'analyse de la séquence de ce chromosome artificiel de bactérie (BAC) a révélé la présence d'un gène, le candidat pour le locus *grey-lethal*.

Des essais spécifiques ont démontré que l'expression du gène candidat était complètement abolie chez la souris homozygote *gl/gl* (Chalhoub N. *et al.* 2003). De plus, l'expression de ce gène était également absente au niveau des OCLs et des mélanocytes, les deux types cellulaires responsables des phénotypes des souris *gl* (Figure 22B). Ce gène fut donc considéré comme le meilleur candidat pour le locus *gl*.

6.4.2 Identification de la mutation *gl*

La structure génomique du locus *gl* révèle la présence d'un gène composé de six exons et de cinq introns couvrant environ 25 Kb (Figure 22A) (Chalhoub N. *et al.* 2003). Des analyses Southern ont mis en évidence un réarrangement génomique majeur chez la souris mutante au niveau du locus *gl*, soit une délétion d'environ 7,5 Kb qui élimine la région promotrice, le premier exon et une grande partie de l'intron 1. De plus, la caractérisation de l'allèle *gl* a mis en évidence, à l'intérieur de la délétion, la présence d'un fragment correspondant à une portion d'un élément répétitif de type LINE-1 (Figure 22A). La caractérisation de la délétion et la

A



B

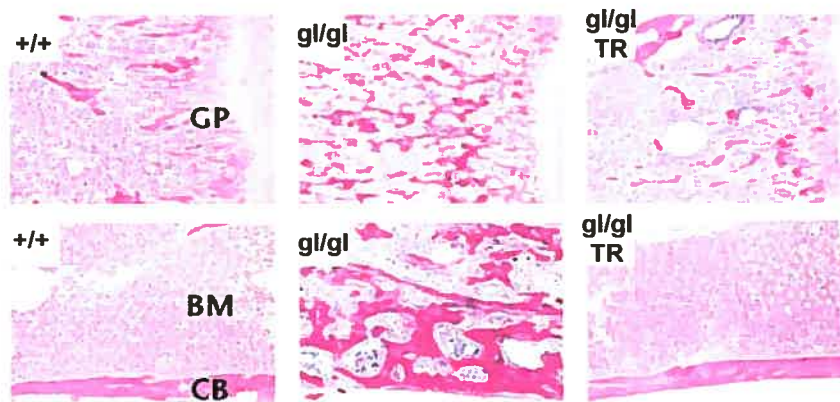


Figure 21 : Identification du gène *gl*

- A) Carte physique et transcriptionnelle de chromosomes artificiels de bactéries (BACs) couvrant un intervalle non recombinant de 500 Kb candidat pour le gène *gl*. Les BACs 165E23, 373N3 et 343H5 ont été utilisés en transgénèse pour une approche de complémentation fonctionnelle.
- B) Histologie des os longs démontrant une complémentation de l'ostéopétrose de la lignée transgénique 373N3 (*gl/gl* TR). Rétablissement d'une homéostasie osseuse adéquate dans la souris homozygote *gl/gl* TR comparativement à la souris *gl/gl* non transgénique.
- (Adapté de Chalhoub N. *et al.* 2003)

présence de cette séquence exogène au niveau du locus *gl* ont permis d'établir un essai PCR permettant de différencier l'allèle *gl* et l'allèle sauvage, facilitant le génotypage et le maintien de la colonie de souris *grey-lethal* (Chalhoub N. *et al.* 2003).

6.4.3 Caractérisation de l'expression du gène *gl*

Le locus *gl* identifié encode pour un transcrit de 3 Kb ubiquitaire dont l'expression a été détectée dans le cerveau, le rein, la rate, les ostéoclastes en culture (OCLs) et les mélanocytes (Figure 22B) (Chalhoub N. *et al.* 2003). Il est à noter que la délétion retrouvée sur l'allèle *gl* mutant abolit l'expression du gène *grey-lethal*. Des analyses complémentaires d'hybridation *in situ* ont également confirmé l'expression du gène *gl in vivo* (Figure 22C). L'expression est détectée au jour E12,5 au niveau du placenta, du foie fœtal et du cerveau. Au jour E15,5, l'expression est plus spécifique et localisée dans les vertèbres en développement ainsi que dans l'épiderme. Au jour 10 après la naissance (P10), l'expression est bien définie dans le cerveau, l'hippocampe, le cervelet, la peau, les reins, la rate, les vertèbres, l'intestin et le thymus (Figure 22C) (Chalhoub N. *et al.* 2003).

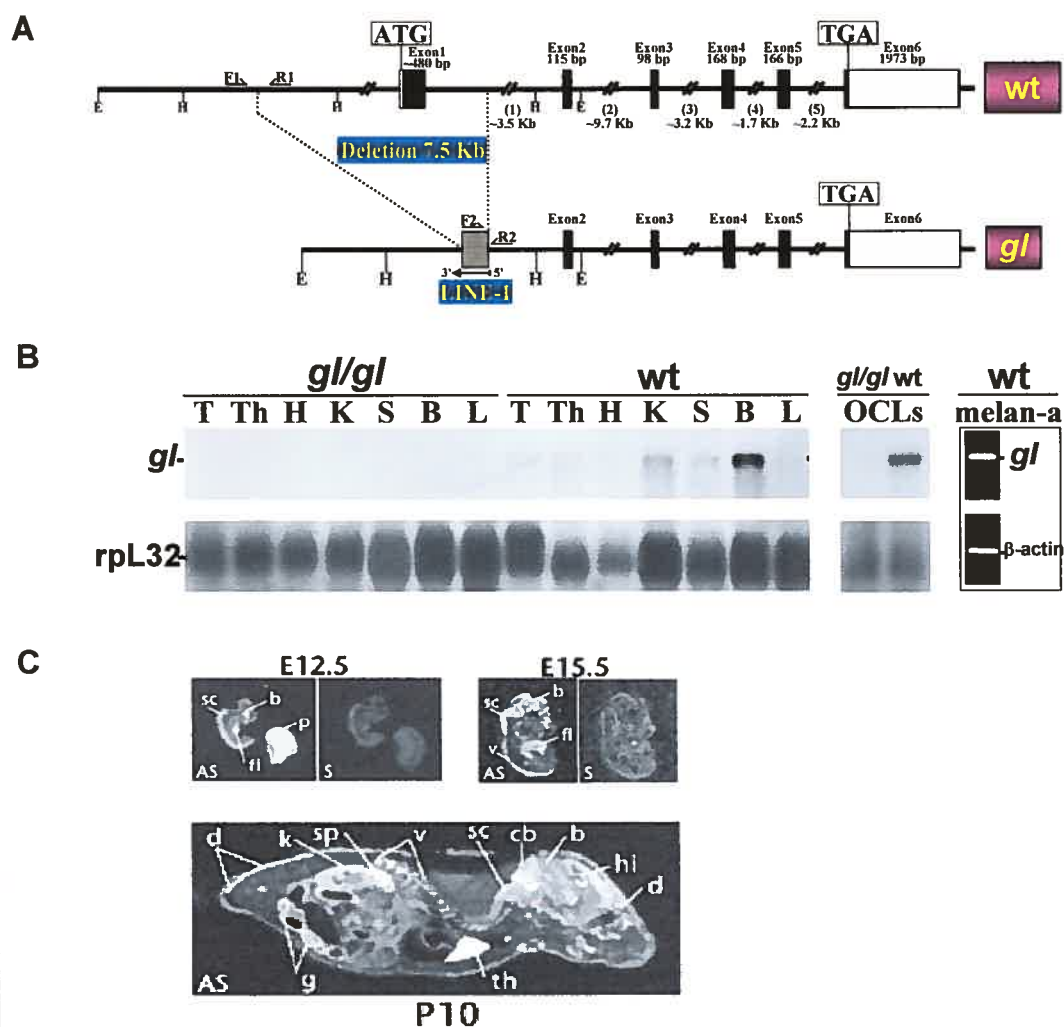


Figure 22 : Caractérisation du gène *gl*

- A) Structure génomique du gène *gl* : WT, allèle sauvage, *gl*, allèle muté. Exons codants (■), exon non codant (□), Séquence de type LINE-1 (▨).
- B) Analyse Northern d'ARN total démontrant le patron tissulaire d'expression du gène *gl* : testicules (T), thymus (TH), cœur (H), reins (K), rate (S), cerveau (B), foie (L), ostéoclastes en culture (OCLs), ostéoblastes primaires (Obs) et mélanocytes (Melan-a).
- C) Analyse *in situ* démontrant l'expression du gène *gl* durant le développement. Placenta (p), foie foetal (fl) cerveau (b), peau (sc), vertèbres (v), hippocampe (hi), cervelet (cb), reins (k), rate (sp), intestins (g), thymus (th).
- (Adapté de Chalhoub N. *et al.* 2003)

6.4.4 Caractérisation de la protéine Gl

Le transcrit du gène *grey-lethal* code pour une nouvelle protéine (Gl ou OSTM1) donc la séquence ne semble pas avoir d'homologie avec des protéines connues. La protéine Gl est composée de 338 acides aminés, comprend un domaine transmembranaire potentiel ainsi qu'un peptide signal à l'extrémité amino-terminale (Figure 23A) (Chalhoub N. *et al.* 2003). Des analyses de type Western ont permis d'identifier deux protéines d'environ 34 kD et 38 kD avec des extraits protéiques d'OCL sauvage (Figure 23B). Ces deux protéines, absentes du contrôle pré-immun, sont ainsi spécifiques à l'anticorps généré contre Gl. De plus, Chalhoub N. *et al.* ont démontré que le locus *gl* code pour un transcrit unique de 3Kb dont l'expression est complètement abolie chez la souris homozygote *gl/gl*. Comme prévu, ces deux protéines sont donc complètement absentes dans des extraits d'OCLs *gl/gl*. Une analyse plus détaillée de la séquence protéique révèle la présence de plusieurs sites potentiels de N-glycosylation qui pourraient être l'origine des deux protéines observées. De plus, une digestion à la PGNase F ou à l'EndoH d'extraits protéiques démontre que la protéine Gl est fortement glycosylée (Beauregard J., résultats non publiés). D'ailleurs, des analyses d'immunofluorescence sur des ostéoclastes primaires révèlent une localisation vésiculaire de la protéine Gl (Figure 23C & APPENDICE IV).

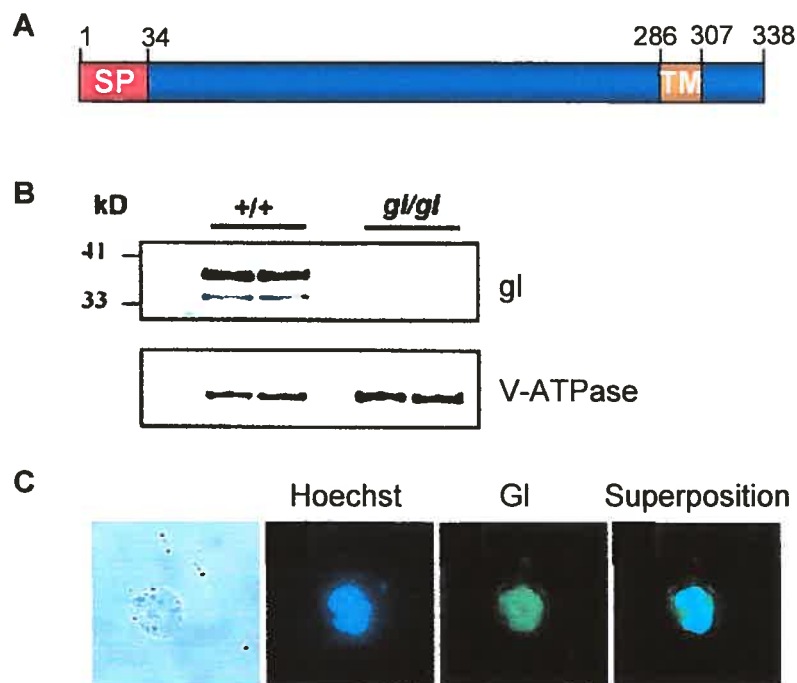


Figure 23 : Caractérisation et immunolocalisation de la protéine Gl

- A) Principales structures de la protéine Gl. Protéine de 338 acides aminés contenant un peptide signal (SP) et un domaine transmembranaire (TM) potentiels.
- B) Analyse Western avec des extraits protéiques d'OCLs avec un anticorps polyclonal produit contre la protéine Gl. Révélation de deux protéines uniques de 34 kD et 38 kD qui sont complètement absentes dans les extraits *gl/gl*.
- C) Localisation cytoplasmique de la protéine Gl (vert) par immunofluorescence sur des ostéoclastes primaires multinucléés (Hoechst, bleu) dérivés de souris sauvage.
(Adapté de Chalhoub N. *et al.* 2003)

6.5 Homologue de la protéine *grey-lethal*

6.5.1 Homologue humain de la protéine *Gl*

Grâce à la séquence de la protéine *Gl* chez la souris, des protéines similaires ont été identifiées chez différentes espèces : *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Rattus norvegicus* et *Homo sapiens*. La protéine humaine contient 334 acides aminés et présente une homologie de 83% avec la protéine de souris. La principale différence entre la protéine de souris et humaine se retrouve dans la partie amino-terminale, principalement au niveau de la séquence potentielle codant pour un peptide signal (Chalhoub N. *et al.* 2003).

6.5.2 Mutation ostéopérotique du gène *Gl* humain

Parmi les divers mutants ostéopérotiques murins décrits dans la littérature (Chapitre 1 : section 3), seules les mutations affectant les gènes codant pour *ClC-7* et H^+ -ATPase ont été décrites comme associées aussi à des ostéopétroses récessives humaines. Or, notre laboratoire a récemment caractérisé la première mutation du gène *Gl* humain associée avec le développement de la forme sévère de la maladie ostéopérotique autosomale récessive infantile humaine (Chalhoub N. *et al.* 2003, Quarello P. *et al.* 2004).

La mutation identifiée est une substitution G→A en position +5 du site d'épissage de l'intron 5. Cette mutation induit un épissage aberrant, produisant un transcrit

tronqué où l'exon 5 est absent. De plus, cette mutation génère un nouveau site de restriction *ApoI*, favorisant ainsi le dépistage génétique et le diagnostic prénatal dans les familles potentiellement à risque (Chalhoub N. *et al.* 2003).

7. Rôle du gène *gl*

Les travaux de notre laboratoire ont démontré que la protéine *gl* est essentielle à la fonction et à la maturation des ostéoclastes et des mélanocytes. Le rôle de cette protéine dans chacun de ces types cellulaires n'est pas encore déterminé, mais fait l'objet de recherches intensives dans notre laboratoire.

Une approche de transgénèse avec des BACs a permis d'identifier un clone capable de compléter la mutation *grey-lethal* (Chapitre 1, Section 6.4.1) indiquant que ce BAC contient le gène *gl*. La détermination de la séquence en ADN de ce clone BAC a démontré qu'il contient un seul gène complet. Ces résultats suggéraient très fortement, mais ne démontrent pas hors de tout doute, que ce gène était bien le gène *gl*. La preuve définitive viendrait plutôt d'une complémentation avec l'ADN complémentaire du gène correspondant.

Ainsi, l'objectif principal de mon projet a été de confirmer l'identité du gène *grey-lethal* (*gl*) ainsi que son rôle *in vivo* dans la maladie ostéopétrotique et dans le déficit de la coloration du poil. Pour ce faire, l'ADN complémentaire du gène *gl* a été utilisé dans une approche de complémentation fonctionnelle ciblée aux ostéoclastes et aux mélanocytes dans les souris transgéniques. Cette approche, qui permet d'exprimer spécifiquement l'ADN complémentaire du gène *gl* au niveau d'un type cellulaire donné, diffère donc de l'approche transgénique BAC. Cette nouvelle approche a permis de démontrer hors de tout doute l'identité du gène

grey-lethal ainsi que son rôle essentiel dans l'homéostasie osseuse et la coloration du poil.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Constructions plasmidiques

1.1 Synthèse de l'ADNc de *gl*

Le fragment correspondant à la séquence codante du gène *gl* a été généré par une réaction de PCR sur un clone qui contient le cDNA pleine longueur (séquence codante et 3' UTR) de *gl* préalablement isolé à partir d'une banque de cDNA (Chalhoub N. *et al.* 2003). Pour ce faire, les amorces choisies encadrent la séquence codante soit l'amorce sens HSPC5'-FOR (Table I) en amont du codon initiateur et l'amorce antisens HSPC3'-REV en aval du codon de terminaison du gène *gl*. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 μ M de dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 2% DMSO, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 μ M de chaque amorce spécifique. Les conditions classiques d'amplification ont été utilisées, soit une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C puis une série de 30 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 72°C suivi de 10 minutes d'élongation finale. Le fragment de 1055 pb ainsi généré a été inséré dans le vecteur pBlueScript (Stratagene) préalablement digéré par *Sma*I. La ligation a été effectuée à 16°C pendant 16 heures dans un volume de 10 μ l en présence du tampon de ligation 1X final (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 10 mM dithiothreitol, 25 μ g/ml BSA), 1mM ATP et 0.2 U de T4 DNA ligase. Des bactéries XL-1 compétentes ont été transformées avec le produit de ligation obtenu et étalées sur un milieu de sélection LB-agar (1% (w/v) Bacto-Tryptone, 0.5% (w/v) Bacto-

Yeast Extract, 1.5% (w/v) Agar, 1% (w/v) NaCl) contenant 100 µg/ml d'ampicilline pour une croissance de 16 heures à 37°C. Plusieurs colonies isolées ont été inoculées et cultivées à 37°C pendant 16 heures dans 2 ml de milieu LB (1% (w/v) Bacto-Tryptone, 0.5% (w/v) Bacto-Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl) contenant 100 µg/ml d'ampicilline. L'ADN plasmidique a été isolé par la méthode de lyse alcaline et a été digéré afin de vérifier la présence et l'orientation de l'insert. Un clone montrant le patron de digestion attendu a été séquencé dans sa totalité par la méthode de terminaison de chaîne avec des didéoxyribonucléotides marqués au ^{33}P avant d'être utilisé pour les clonages subséquents.

1.2 Préparation de la construction pTYR-gl

Pour la construction pTYR-gl, le fragment de 1055 pb correspondant à la séquence codante du gène *gl* (Figure 24A) a été excisé de son vecteur d'origine par une digestion XmaI/SpeI. Le vecteur pTyr (Figure 24B) contenant les séquences régulatrices (promoteur et S/MAR) du gène de la tyrosinase (TYR) totalisant 6.1 Kb a été également digéré XmaI/SpeI. Les deux fragments ont été ligués à 16°C pendant 16 heures dans les conditions décrites précédemment. Le produit de ligation ainsi généré a été transformé dans des bactéries compétentes XL-1. L'ADN plasmidique de certaines colonies a été isolé et vérifié par diverses digestions diagnostiques. Un clone pTYR-gl a été sélectionné pour le clonage subséquent.

La séquence exonique et intronique du gène hGH (Figure 24D) a été excisée de son vecteur d'origine (pBluescript) par digestion BamHI/SacII. Ce fragment de 2.1 Kb a été inséré dans le vecteur pTYR-gl également digéré avec BamHI/SacII. La ligation et la transformation ont été effectuées dans les conditions décrites précédemment. Les colonies ainsi obtenues ont été analysées par PCR avec les amorces HSPC-FOR1 et hGH- REV1 localisées respectivement dans le cDNA de *gl* et dans le premier intron de hGH. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH8.3, 50 mM KCl) avec 250 µM de dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 µM de chaque amorce spécifique. Les conditions classiques d'amplification ont été utilisées avec une température d'appariement de 60°C. L'ADN plasmidique des colonies positives a été préparé et analysé par diverses digestions diagnostiques. Les extrémités d'un des clones positifs pTYR-gl-hGH ont été séquencées avec les amorces PUCM13-FOR et PUCM13-REV par la méthode de terminaison de chaîne avec des didéoxyribonucléotides marquées au ³³P avant la purification du transgène.

1.3 Préparation de la construction pTRAP-gl

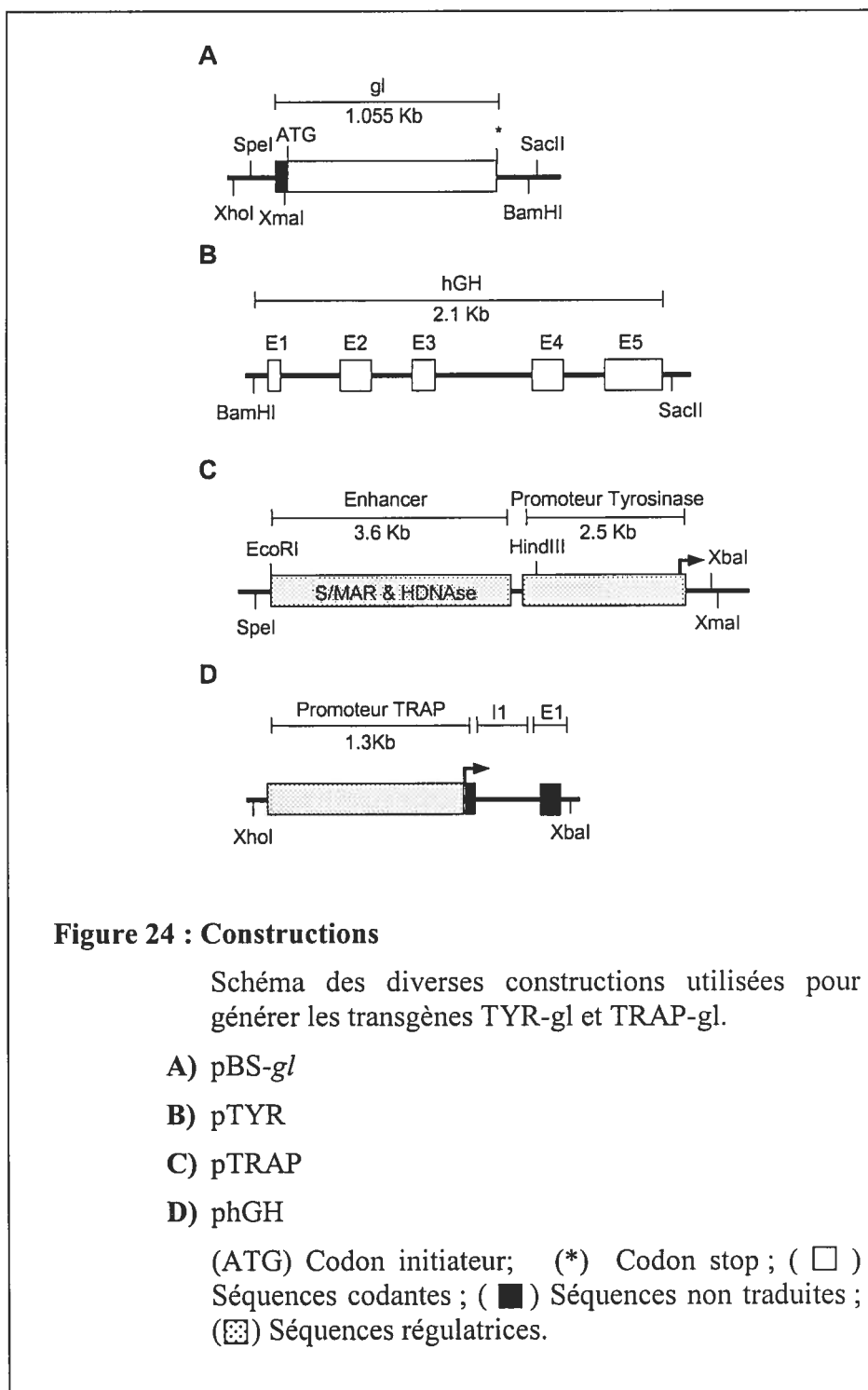
Pour la construction pTRAP-gl, le promoteur de 1.8 Kb de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) (Figure 24C) a été excisé de son vecteur d'origine par une digestion XhoI/XbaI. La construction pTYR-gl, décrite ci-haut, a été utilisée et digérée par XhoI/XbaI, permettant d'éliminer le promoteur pTYR afin de le

remplacer par le promoteur TRAP. Les deux fragments ont été liés et transformés dans les bactéries compétentes XL-1. Les colonies ainsi obtenues ont été analysées par PCR avec les amorces PUCM13-FOR et TRAP-REV localisées respectivement dans le plasmide pBS et dans la séquence régulatrice TRAP. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH8.3, 50 mM KCl) avec 250 μ M de dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 μ M de chaque amorce spécifique. Les conditions classiques d'amplification ont été utilisées avec une température d'appariement de 60°C. L'ADN plasmidique des colonies positives a également été préparé et analysé par diverses digestions diagnostiques. Les extrémités d'un des clones positifs pTYR-gl-hGH ont été séquencées avec les amorces PUCM13-FOR et PUCM13-REV par la méthode de terminaison de chaîne avec des didéoxyribonucléotides marquées au ^{33}P .

1.4 Préparation plasmidique sur gradient de chlorure de césium

Les deux constructions ont été inoculées dans un volume de 6 ml de LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline puis incubées à 37°C pendant 6 heures. L'inoculum a été transféré dans un volume de 500 ml de LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline puis incubé à 37°C pendant 16 heures avec agitation. L'ADN plasmidique de chacun des clones a été préparé par lyse alcaline. L'ADN plasmidique ainsi préparé est purifié par ultracentrifugation sur gradient de césium. La concentration des solutions d'ADN obtenue pour chacun des transgènes a été mesurée grâce à la

densité optique (D.O.) à 260 nm et leur pureté a été évaluée par le rapport D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀. Les ADNs ont également été caractérisés suite à des digestions enzymatiques appropriées.



2. Transgène et microinjection

2.1 Préparation des transgènes

Les deux constructions destinées à produire les souris transgéniques ont été excisées par une digestion NotI/XhoI afin d'éliminer les séquences procaryotiques et isoler les fragments à injecter. Ainsi, la taille des fragments était respectivement de 9.3 Kb pour le transgène TYR-gl et de 5 Kb pour le transgène TRAP-gl. Une migration sur gel d'agarose a été effectuée afin de vérifier la qualité de la digestion et la présence des fragments destinés à servir pour la microinjection. Une estimation de leur concentration a été faite sur gel d'agarose avec les marqueurs appropriés.

2.2 Microinjection

Chaque transgène linéaire a été injecté (1 ng/ μ l) dans les œufs fertilisés obtenus à partir d'un croisement de souris F₁(C57BL/6 X C3H) X C57BL/6.

3. Identification des souris transgéniques

3.1 Préparation de l'ADN

L'ADN génomique des souris fondatrices a été isolé par la méthode d'extraction au phénol/chloroforme. Un fragment de queue a été incubé 16 heures à 55°C dans

le tampon de digestion (10 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl et 10% SDS) en présence de 10 µl de protéinase K (20 mg/ml). Une extraction au phénol/chloroforme a été effectuée et l'ADN précipité avec de l'éthanol 95% en présence de 0.3 M de sodium acétate. L'ADN a finalement été resuspendu dans un volume de 100 µl de TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Un rendement d'environ 1 µg/µl d'ADN génomique a ainsi été obtenu.

3.2 Identification des souris transgéniques par PCR

La présence du transgène TYR-gl ou TRAP-gl a été vérifiée par une analyse PCR sur 100 ng d'ADN génomique isolé tel que décrit précédemment.

Pour les souris TYR, les amorces pTYR-FOR et HSPC-REV1, utilisées pour l'essai PCR, encadrent la jonction entre la séquence régulatrice TYR et le cDNA de *gl*. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 µM de dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2% DMSO, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 µM de chaque amorce spécifique. Les conditions classiques d'amplification ont été utilisées avec une température d'appariement de 63°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1%.

Pour les souris TRAP, les amorces pTRAP-FOR et HSPC-REV1, utilisées pour l'essai PCR, encadrent la jonction entre la séquence régulatrice TRAP et le cDNA

de *gl*. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 μ M de dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 2% DMSO, 50 mM KCl, 5 mM NH_4Cl , 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 μ M de chaque amorce. Les conditions classiques d'amplification ont été utilisées avec une température d'appariement de 65°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1%.

3.3 Caractérisation de l'intégrité du transgène par Southern

Les souris transgéniques ont été de plus caractérisées pour l'intégrité génomique du transgène par une analyse Southern avant d'être utilisées pour générer des lignées transgéniques TYR-*gl* et TRAP-*gl*. Une analyse Southern a également été utilisée afin de déterminer le nombre de copie du transgène intégré dans chaque lignée transgénique TYR-*gl* et TRAP-*gl*.

Dix microgrammes d'ADN génomique de chacune des lignées de souris transgéniques préparés tel que décrit précédemment ont été digérés 16 heures à 37°C avec 10 U de HindIII ou EcoRV ou EcoRI. Les échantillons digérés ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1.0% dans le TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). Le gel a été coloré au bromure d'éthidium, photographié et traité pendant 30 minutes dans une solution dénaturante (1.0 M NaCl et 0.5 M NaOH) suivi de 20 minutes dans une solution neutralisante (3.0 M NaCl et 0.5 M Tris pH 7.4). L'ADN a été transféré avec du SSC 20X (3.0 M NaCl et 0.15 M

sodium citrate pH 7.0) sur des membranes de nylon (Osmonics Inc.) selon la technique de Southern. L'ADN transféré a été fixé (cross-link) à la membrane par exposition de 10 minutes aux UVs.

3.4 Synthèse d'une sonde radioactive

La sonde utilisée pour la caractérisation des deux lignées transgéniques TYR-gl et TRAP-gl a été préparée par PCR. L'amorce sens HSPCEx1-FOR et antisens HSPCEx1-REV utilisées pour cette réaction PCR sont localisées dans le premier exon du gène *gl*. La matrice utilisée pour cette réaction de PCR correspond à cent nanogrammes d'ADN plasmidique du clone pBS-gl décrit précédemment (Figure M1). La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 µM de dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 µM de chaque amorce. Les conditions classiques d'amplification ont été utilisées avec une température d'appariement de 65°C. Le produit de PCR a été purifié sur gel d'agarose, électroélué et précipité à l'éthanol 95% en présence de 0.2 M de NaCl. Les sondes correspondant aux séquences hGH (2.1 Kb), TRAP (1.8 Kb) et TYR5' (3 Kb) ont été préparées par digestion enzymatique sur les plasmides d'origine (Figure 24). Les fragments ont été purifiés sur gel d'agarose, électroélués et précipités à l'éthanol 95% en présence de 0.2 M de NaCl. Les ADNs sont resuspendus dans le TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) et dosés sur gel d'agarose avec des marqueurs appropriés. Cent

nanogrammes d'ADN ont été utilisés pour préparer une sonde marquée au ^{32}P par la technique de « Nick translation ».

3.5 Préhybridation et hybridation

Les membranes ont été préhybridées à 65°C durant 4 heures dans une solution de 5X SSC (1.5 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 10X Denhart, 0.1% SDS et de l'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé (2 mM final). L'hybridation a été faite à 65°C durant 16 heures en présence de la sonde marquée. Les membranes ont été lavées dans la solution I (SSC 2X (0.6 M NaCl, 0.03 M sodium citrate), SDS 0.1%) 20 minutes à température de la pièce et dans la solution II (SSC 1X (0.3 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), SDS 0.1%) 20 minutes à 65°C et finalement dans la solution III (SSC 0.1X (0.03 M NaCl, 1.5 mM sodium citrate), SDS 0.1%) 10 minutes à 65°C. Les membranes lavées ont été exposées avec des films X-OMAT BT (Eastman Kodak Co.) pendant 24-72 heures à -80°C.

4. Établissement de lignées transgéniques

4.1 Croisements F1

Afin de vérifier la complémentation des phénotypes grey-lethal, nous avons généré des souris transgéniques *gl/gl*. Chacune des souris fondatrices TYR-*gl* et TRAP-*gl*, au nombre de quatre pour chaque transgène, a été croisée avec des souris hétérozygotes *gl/+* (Figure 25). La progéniture (F1) a été analysée, tel que décrit

ci-haut, pour la présence du transgène par analyse PCR ainsi que son intégrité génomique par analyse Southern. Les souris F₁ sont également analysées pour le génotype *gl* par PCR tel que décrit par Chalhoub N. *et al.*, 2003. Les amorces *gl*-FOR1 et *gl*-REV1 ainsi que *gl*-FOR2 et *gl*-REV2 ont été utilisées pour l'essai PCR. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 µM de dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 mM NH₄Cl, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 µM de chaque amorce spécifique. Les conditions d'amplification utilisées comprennent une étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C puis une série de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C suivi de 10 minutes d'élongation finale.

5. Préparation de l'ARN

5.1 Extraction d'ARN des souris transgéniques TYR-*gl*

Les ARNs totaux des organes frais ou gardés à -80°C d'une souris F₁ ont été isolés. Pour chacun des organes, l'ARN a été préparé par extraction au TRIzol selon de protocole fourni par le manufacturier. L'ARN a été resuspendu et conservé dans une solution d'eau DEPC à -80°C jusqu'à utilisation. La concentration des ARNs obtenus pour chacun des tissus a été mesurée grâce à la D.O. à 260 nm et leur pureté évaluée par le rapport D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀. La qualité de l'ARN quantifié a été vérifiée sur gel d'agarose 1.5% en condition dénaturante

(11.5% formaldéhyde) par l'identification et l'intégrité des ARNs ribosomiques 18S et 28S.

De la peau dorsale dépourvue de poils d'une souris adulte a été prélevée stérilement et conservée à -80°C. La peau dorsale de souris âgées de 3 jours a été prélevée stérilement et incubée dans une solution 0,25% de Trypsine dans du PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) 16 heures à 4°C, permettant ainsi de séparer les différentes couches de l'épiderme. La couche basale de l'épiderme, qui est enrichie en mélanocytes, a été prélevée et vigoureusement resuspendue. Chaque échantillon a été centrifugé 5 minutes à 2000 rpm et le culot cellulaire a été conservé à -80°C. L'ARN total de ces tissus a été préparé par extraction au TRIzol (Invitrogen).

5.2 Extraction d'ARN des souris transgéniques TRAP-gl

Les ARNs totaux des organes frais ou gardés à -80°C d'une souris F₁ ont été isolés. Pour chacun des organes, l'ARN total a été préparé par la méthode du chlorure de Lithium-Urée (Vacher J. *et al.* 1990).

Des co-cultures sont préparées avec chacune des lignées transgéniques TRAP-gl tel que décrit par Rajapurohitam V. *et al.*, 2001. En résumé, des ostéoblastes primaires issus de calvaria de nouveaux-nés ont été isolés et mis en culture jusqu'à semi-confluence dans un pétri de 100 mm en présence de MEM 10% FBS. Des

suspensions cellulaires de moelle osseuse ou de rate ont été préparées à partir de souris F1 adultes transgéniques et contrôles de la même portée. Pour chaque pétri 25x10⁶ cellules, moelle osseuse ou rate, ont été ajoutées à la culture d'ostéoblastes et incubées pendant une période de 6-7 jours en présence de 10⁻⁸ M de vitamine D3 et 10⁻⁵ M prostaglandine E2. Le milieu de culture a été renouvelé dans sa totalité au deuxième et au quatrième jour de culture. La couche confluite d'ostéoblastes a été éliminée grâce à un traitement avec une solution de 0.1% collagénase et 0.2% dispase dans le MEM. La qualité de la culture a été évaluée par une coloration TRAP (Rajapurohitam V. *et al*, 2001). L'ARN total des OCLs a été préparé par extraction au TRIzol.

6. Caractérisation de l'expression des transgènes

6.1 Expression du transgène TYR-gl

L'expression du transcrit transgénique TYR-gl a été analysée par RT-PCR sur divers tissus. De plus, afin de vérifier la spécificité du transgène TYR-gl dans les mélanocytes l'expression a également été analysée au niveau de la peau adulte de souris et sur des préparations cellulaires de la couche basale de l'épiderme (BCL).

6.1.2 RT-PCR

La synthèse d'ADN complémentaire a été effectuée dans un volume de 20µl à partir de 1 µg d'ARN total préparé tel que décrit avant. La réaction de

transcription reverse a été effectuée avec 1.5 μ M d'amorce poly-dT, 0.5 mM de chacun des dNTP, 10 mM DTT, et 10 U/ μ l de SuperScript™ II Reverse Transcriptase dans un tampon de RT-PCR 1X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂). La réaction a été incubée pendant 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70 °C afin d'inactiver l'enzyme. La réaction PCR a été effectuée sur une dilution 1/5 de la réaction de transcription inverse. L'amorce sens HSPCEx3-FOR et l'amorce antisens hGHEx1/2-REV et/ou hGHEx2/3-REV ont été utilisées pour l'essai PCR à la fois pour transgène TYR-gl et le transgène TRAP-gl (Table II). Les amorces HSPCEx3-FOR et HSPCEx6-REV ont été utilisées pour l'essai PCR afin de vérifier l'expression du gène gl endogène. L'amorce β -actine-FOR et β -Actine-REV ont été utilisées afin de vérifier l'expression du gène de la β -actine comme contrôle et les amorces TRAPEx3-FOR et TRAPEx6-REV pour l'amplification du gène TRAP. Toutes les réactions de PCR ont été effectuées dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 μ M de dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 unité de Taq polymérase (Invitrogene) et 0.6 μ M de chaque amorce spécifique. Les conditions d'amplification comprenaient de 5 minutes de dénaturation initiale à 94°C, suivies d'une série de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 65°C et 30 secondes à 72°C puis de 10 min d'élongation à 72°C. Les divers produits PCRs ont été analysés soit sur gel d'agarose 1.4% (coloration bromure d'éthidium) ou suite à une hybridation avec une sonde radioactive et analyse Southern (voir sections 3.4 et 3.5 du présent chapitre).

6.2 Expression du transgène TRAP-gl

L'expression du transcrit correspondant au transgène TRAP-gl a été analysée par Northern sur divers tissus. L'expression du transgène TRAP-gl a également été vérifiée sur des préparations d'ARN d'OCLs (*osteoclaste like cells*) générées in vitro. L'expression du transcrit correspondant au transgène TRAP-gl dans les OCLs a été analysée par RT-PCR tel que décrit précédemment.

6.2.1 Northern

Quinze microgrammes d'ARNs totaux de chacun des organes ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% en condition dénaturante (11.5% formaldéhyde) et transférés sur membrane de nylon (Osmonics) (Maniatis et *al.*, 1983). L'ARN messenger de certains tissus a été préparé et deux microgrammes d'ARNm ont également été analysés par Northern tel que décrit ci-haut. Les ARNs transférés ont été fixés à la membrane par exposition de 10 minutes aux UVs. La préhybridation, l'hybridation ainsi que l'exposition du Northern ont été effectuées dans les conditions décrites précédemment. La sonde utilisée, correspondant aux 5 derniers exons du gène *gl*, a été préparée par PCR à l'aide des amorces HSPCEx1-FOR et HSPCEx6-REV. La réaction de PCR a été faite dans un tampon de PCR 1X final (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl) avec 250 µM de dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 unité de Taq polymérase et 0.6 µM de chaque amorce. Les conditions

classiques d'amplification ont été utilisées avec une température d'appariement de 65°C. Cent nanogrammes d'ADN ont été utilisés pour préparer une sonde marquée radioactive tel que décrit précédemment.

7. Complémentation phénotypique

7.1 Croisements F2

Les souris F1 issues des premiers croisements ont à nouveau été croisées avec des souris hétérozygotes *gl/+* afin de générer des souris homozygotes *gl/gl* transgéniques pour chacun des transgènes (Figure 25). La progéniture (F2) issue de ces croisements a été analysée par PCR pour la présence du transgène ainsi que pour le génotype *gl*.

7.2 Phénotype et radiographie

Les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques pour chacun des transgènes ont été analysées pour une complémentation phénotypique soit le développement de la cavité médullaire et/ou la coloration du poil. Les souris ont été euthanasiées. Une analyse radiologique a été effectuée avec un appareil Faxitron et une exposition de 18 Kv, 10 sec sur film X-OMAT BT (Eastman Kodak Co.).

7.3 Analyse histologique

Les os ont été prélevés chez des souris transgéniques de 3 semaines de même que chez des souris contrôles du même âge afin d'effectuer une analyse histologique. Les os prélevés ont été fixés 24 heures dans une solution de formaldéhyde 3.7% dans du PBS 1X (v/v) et décalcifiés dans une solution 0.5 M EDTA durant une semaine à 4°C. Après l'enrobage dans la paraffine, des coupes (5 µm) ont été réalisées à partir de chaque échantillon. Les lames ont été colorées avec Hématoxyline/Éosine et visualisées en microscopie optique (Zeiss).

Table I: Séquences des amorces PCR

Nom	Séquence
HSPC5'- FOR	5' - GGC GAG CTA TCT TTG ACA GTC C - 3'
HSPC3'- REV	5' - TTA CTG GCA CAA CGT GAG GTC - 3'
HSPC-FOR1	5' - GTG GTT GCT GTG TCT GTG GTT CA - 3'
hGH-REV1	5' - GTC CCA TCT ACA GGT CGC TG - 3'
PUCM13-FOR	5' - GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG - 3'
PUCM13-REV	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
TRAP-REV	5' - CCT CGC CAT CAT AAA CAG C - 3'
pTYR-FOR	5' - GAG AGG CAA CTA TTT TAG ACT GAT TAC - 3'
HSPC-REV1	5' - CAA GTC CTG CAC CTC CAA CAG - 3'
pTRAP-FOR	5' - GTC CTC ACC AGA GAC TCT GAA C - 3'
HSPCE _x 1-FOR	5' - GTC GGC ACC CAG GCT TTG - 3'
HSPCE _x 6-REV	5' - GGT GCT CGA CTT GAG ACG TTT G - 3'
HSPCE _x 1-REV	5' - GTT GTC CAG CTT GAT TGC G - 3'
GI-FOR1	5' - CCT CTG GAA GAC TAA TAC TTG CTG - 3'
GI-REV1	5' - GCC TGG AAC AGA GCA AAG C - 3'
GI-FOR2	5' - GCT ACA TCT GGG TCC TTT CG - 3'
GI-REV2	5' - CGC TTG CTT TTG TCT GTT ACC TTT GTG TTC - 3'

Table II: Séquences des amorces RT-PCR

Nom	Séquence
HSPCEx3-FOR	5' - CCT GCT TTG AGC ATA ACC TGC - 3'
hGHEx1/2-REV	5' - GAC GTC CGG GAG CCT GTA G - 3'
hGHEx2/3-REV	5' - TGG GAT ATA GGC TTC TTC AAA CTC - 3'
HSPCEx6-REV	5' - CTG CAG TCC CAA CAT TTC GTG AG - 3'
β -Actine - REV	5' - GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT C - 3'
β -Actine - FOR	5' - CAA GGC TCC GGC ATG TGC - 3'
TRAPEx3-FOR	5' - TGT TCT CTG ACC GTG CCC TTC - 3'
TRAPEx6-REV	5' - CCC ACT CAG CAC ATA GCC CA - 3'

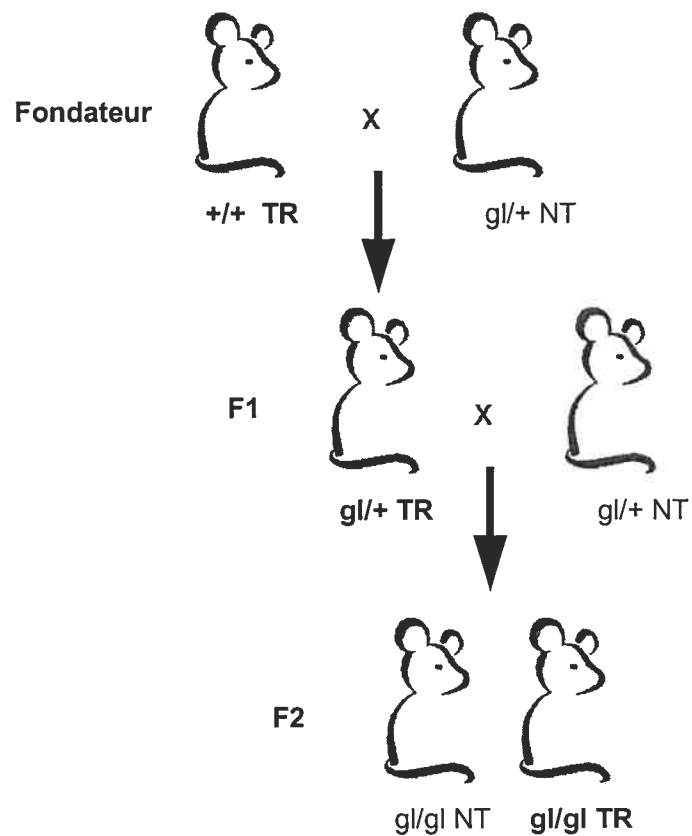


Figure 25: Croisements F1 et F2 des lignées transgéniques.

Représentation schématique des croisements effectués afin de générer des souris homozygotes *gl/gl* transgéniques. (TR, transgénique; NT, non transgénique)

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

SECTION A : Coloration du poil

1. Transgène spécifique aux mélanocytes

Afin de vérifier la complémentation *in vivo* du phénotype de la coloration du poil chez la souris grey-lethal, l'expression de *gl* a été ciblée aux mélanocytes dans les souris transgéniques par le promoteur du gène de la tyrosinase.

1.1 Construction pTYR-gl

Les séquences régulatrices du gène de la tyrosinase murin ont été utilisées afin d'induire une expression spécifique du gène *gl* au niveau des mélanocytes. Le promoteur choisi contient la séquence d'activation distale de 3.6 Kb correspondant à la région -15 Kb, ainsi que le promoteur proximal de 2.5 Kb du gène de la tyrosinase (Figure 26A). La région codante du gène *gl* de souris, soit du codon initiateur au codon stop, totalisant 1055 pb a été clonée en aval de ces séquences régulatrices (Figure 26A). De plus, en 3' de la construction, la séquence génomique du gène humain de l'hormone de croissance (hGH), incluant les séquences introniques et exoniques ainsi que le site de poly-adénylation, a été ajoutée. Ces séquences assurent une stabilisation et un épissage du transcrit transgénique lors de la transcription (Figure 26A). Il est à noter que la construction a été conçue de façon à pouvoir être excisée du vecteur plasmidique avant la microinjection. Cette étape permet d'éliminer les séquences procaryotiques qui peuvent interférer avec l'expression du transgène chez la souris. Une fois la construction linéarisée, ces différents éléments totalisant 9.3 Kb (Figure 26A) représentent le transgène TYR-gl.

2. Production et caractérisation de souris fondatrices

2.1 Identification des souris fondatrices TYR-gl

La construction pTYR-gl linéarisée a été microinjectée dans les œufs fertilisés obtenus à partir d'un croisement de souris F₁ (C57BL/6 X C3H) X C57BL/6. Les souris fondatrices obtenues ont été initialement analysées pour la présence du transgène par une analyse PCR. Cet essai utilise des amorces spécifiques encadrant une jonction unique au transgène entre le promoteur tyrosinase et la séquence codante du gène *gl*. Le produit PCR de 900 pb amplifié à partir de l'ADN génomique des souris fondatrices est ainsi spécifique au transgène sans amplifier aucune séquence génomique endogène (Figure 26B). L'ADN génomique extrait d'une souris de souche C57BL/6 non transgénique a été utilisé comme contrôle négatif pour la réaction de PCR. Sept fondatrices ont été identifiées par cette approche, mais seulement quatre (#438, #475, #478, #483) ont été utilisées afin d'établir des lignées transgéniques.

2.2 Caractérisation des souris fondatrices TYR-gl

Les quatre fondatrices choisies ont été caractérisées en détail par diverses analyses Southern afin de vérifier l'intégrité génomique du transgène. Une digestion EcoRV de l'ADN génomique de ces souris a permis de vérifier l'intégrité du transgène en 3' avec une sonde localisée dans le gène hGH. Le fragment de 5 Kb révélé correspond au gène *gl* et au gène hGH (Figure 26C) utilisés dans la

construction transgénique. Une sonde localisée dans le promoteur pTYR a permis de vérifier l'intégrité du transgène en 5' sur ce même Southern. Le nombre de copies du transgène a été évalué par une analyse Southern. L'ADN génomique des souris fondatrices a été digéré par HindIII et la membrane hybridée avec une sonde localisée dans le premier exon du gène *gl*. Ainsi, cette sonde révèle à la fois un fragment de 1 Kb correspondant au transgène et un fragment de 6Kb correspondant au gène *gl* endogène. La comparaison entre l'intensité de ces bandes permet d'estimer le nombre de copies de transgène intégré (Figure 26D). Le nombre de copies du transgène intégré au niveau des quatre souris fondatrices (F₀) varie de 2 à 20 (Figure 26E). Il est à noter que les analyses Southern ont également permis de démontrer l'orientation tête-à-queue des diverses copies du transgène localisées à un site unique d'intégration.

3. Génération de lignées transgéniques TYR-gl

3.1 Croisements F1

Chacune des souris fondatrices TYR-gl a été utilisée afin de vérifier la complémentation phénotypique chez la souris homozygote *gl/gl* transgénique. Pour ce faire des lignées de transgéniques ont été générées en croisant les fondatrices TYR-gl par des souris hétérozygotes *gl/+* (Chapitre 2 : Figure 25). La progéniture (F₁) issue de chaque souris fondatrice est utilisée afin d'établir une lignée transgénique. Toutes les souris d'une même lignée transgénique portent le .

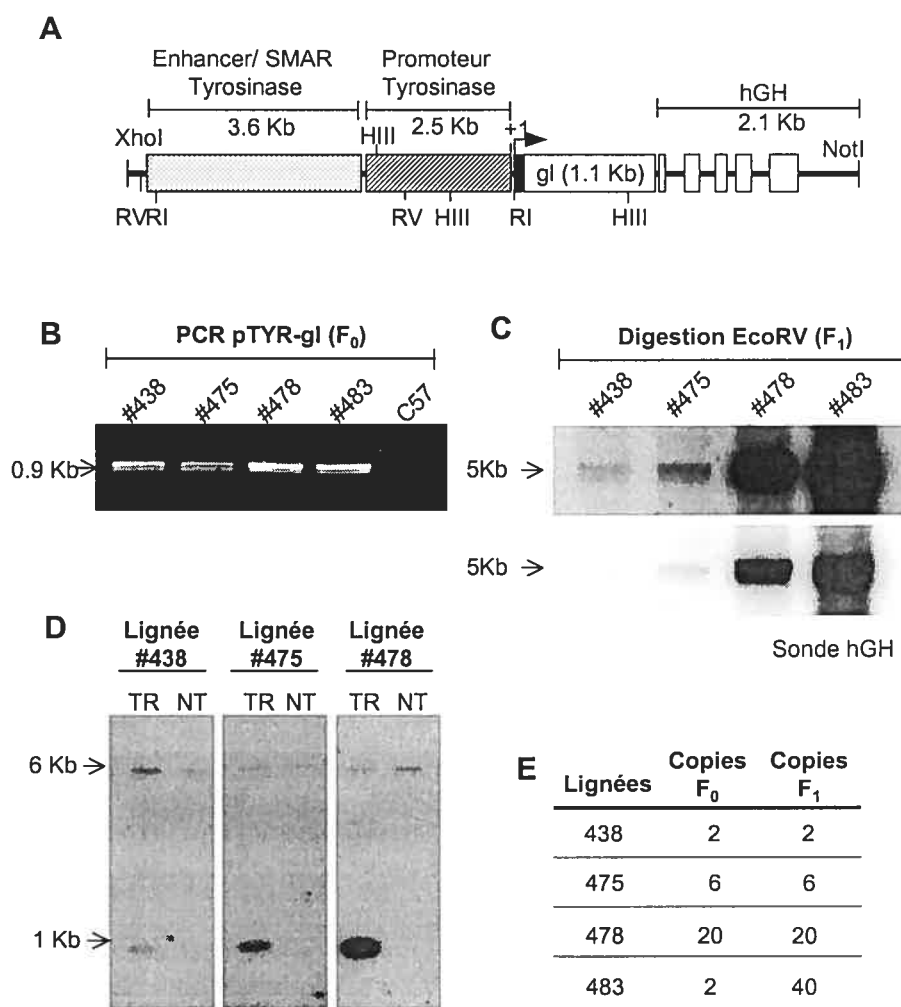


Figure 26: Identification et caractérisation des souris TYR-gl.

- A)** Représentation schématique de la construction pTYR-gl; Séquences distale (▤) et proximale (▥) du promoteur TYR, Séquence codante (□) du gène gl, Séquences intronique (—) et exonique (□) du gène hGH.
- B)** Identification des fondatrices (F₀) TYR-gl par PCR
- C)** Caractérisation des lignées transgéniques (F₁ gl/+ TR) TYR-gl par analyse Southern, exposition longue (48 heures) (haut) et courte (16 heures) (bas) de l'autoradiogramme.
- D)** Caractérisation du nombre de copies du transgène TYR-gl par analyse Southern, endogène à 6 Kb et transgène à 1 Kb (TR, transgénique; NT, non transgénique).
- E)** Tableau récapitulatif du nombre de copie du transgène TYR-gl intégrées au niveau de la souris fondatrice et de lignées établies.

même nombre de copies du transgène intégré au même locus chromosomique. Ainsi, la progéniture (F_1) issue de ces divers croisements a été analysée par PCR ainsi que par Southern afin de vérifier la présence et l'intégrité du transgène. Seule la progéniture de la fondatrice #483 présentait une variation du nombre de copies du transgène intégré. Des analyses Southern plus détaillées ont permis de démontrer la présence de plus de 40 copies intégrées en tandem au niveau de l'ADN génomique de cette lignée. Ainsi, la fondatrice #483 ayant un nombre d'intégrations différent au niveau des gamètes est dite mosaïque. Ce phénomène survient lorsque l'intégration du transgène se fait à une étape ultérieure au stade d'une cellule lors de la microinjection. En plus de vérifier la présence du transgène, les souris ont également été analysées pour le génotype *gl* par PCR. Cet essai, décrit par Chalhoub N. *et al.*, 2003, permet d'amplifier à la fois l'allèle sauvage et l'allèle *gl* grâce à quatre amorces différentes. Les deux produits d'amplification PCR sont de tailles différentes et peuvent donc être distingués sur gel d'agarose. Ainsi, pour chacune des lignées, les souris transgéniques hétérozygotes *gl/+* ont été utilisées pour des analyses d'expression.

4. Caractérisation de l'expression du transgène TYR-gl

4.1 Expression du transgène TYR-gl

Une analyse de RT-PCR a été utilisée pour vérifier l'expression spécifique du transgène TYR-gl. Pour ce faire, les ARNs totaux de divers organes tels que le cerveau, le foie, la rate, le rein, le thymus, ainsi que les yeux ont été préparés à

partir d'une souris hétérozygote *g*l/+ transgénique âgée de trois semaines. Une souris hétérozygote *g*l/+ non transgénique de même âge a parallèlement été utilisée comme contrôle négatif pour l'analyse d'expression. En plus de ces organes, l'expression a également été analysée avec des ARNs totaux issus de la peau adulte ainsi que d'une préparation cellulaire de la couche basale de l'épiderme (BCL) enrichie en mélanocytes. Les amorces sens HSPCEx3-FOR et l'amorce antisens hGHEx1/2-REV permettent une amplification spécifique du messenger transgénique, puisque l'amorce antisens chevauche à la fois l'exon 2 et l'exon 1 du gène hGH présent uniquement dans le transgène épissé. Ainsi, si un contaminant d'ADN génomique est présent dans la préparation d'ARN, il ne sera pas amplifié lors de la réaction de PCR. L'analyse de RT-PCR démontre que l'expression du transgène, dans la lignée #438, est observée uniquement dans les yeux, la peau adulte et la couche basale de l'épiderme chez la souris transgénique (Figure 27A). Aucune expression du transgène n'a été observée dans les mêmes tissus isolés de la souris contrôle non transgénique. Le gène *g*l présente une expression ubiquiste dans les tissus transgéniques et non transgéniques. L'expression du gène de la β -actine a été utilisée comme contrôle quantitatif et qualitatif de l'expérience de RT-PCR. Il est à noter que le patron d'expression du transgène est identique pour les quatre lignées transgéniques TYR-*g*l, démontrant la spécificité du promoteur tyrosinase.

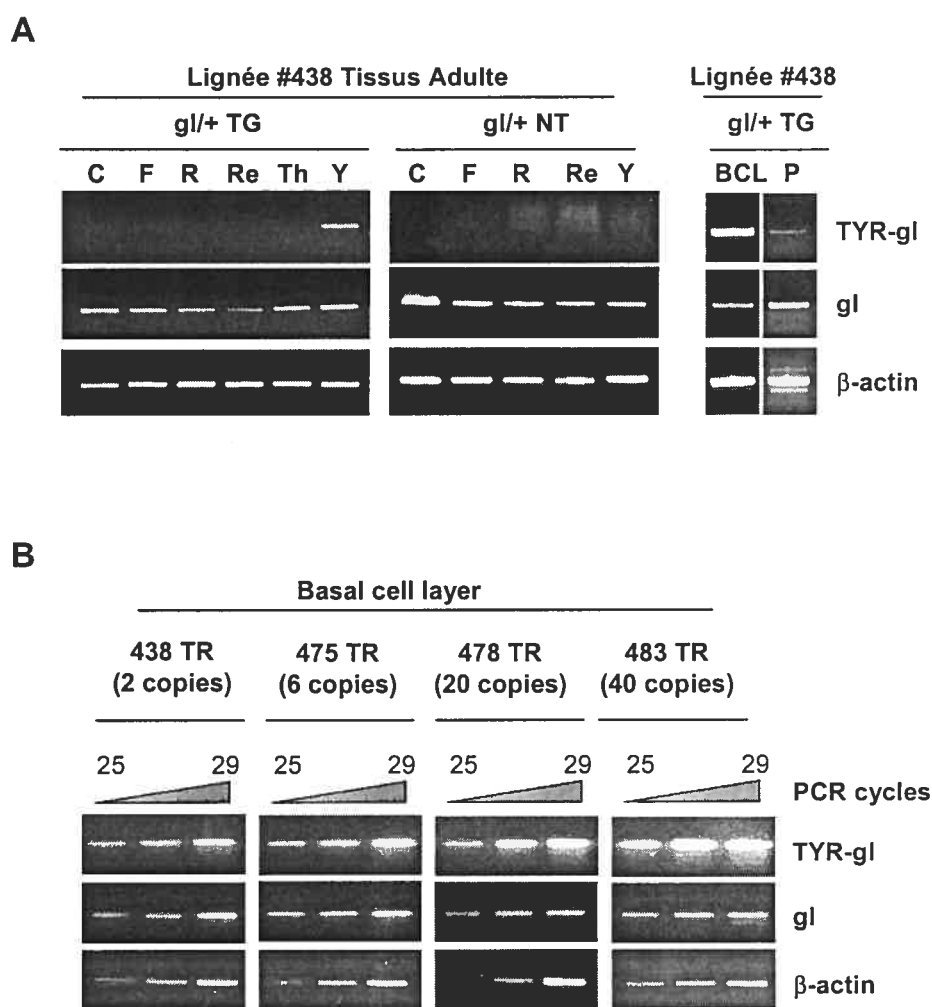


Figure 27 : Analyse d'expression du transgène TYR-gl

- A)** RT-PCR sur les ARN isolés de tissus adultes et préparation cellulaire de la couche basale de l'épiderme de souris (F_1) *gl/+* transgéniques (TR) et non transgéniques (NT) de la lignée #438 C, cerveau; F, foie; R, rate; Re, reins; Th, thymus; Y, yeux, BCL, couche basale de l'épiderme; P, peau.
- B)** RT-PCR semi-quantitatif sur une préparation cellulaire de la couche basale de l'épiderme de souris *gl/+* des lignées TYR-gl. Les produits d'amplification TRY-gl et gl ont été révélés par hybridation avec une sonde radioactive correspondant à l'exon 5-6 du gène *gl*.

4.2 Expression dépendante du nombre de copie du transgène TYR-gl

La séquence de régulation distale -15 Kb du gène de la Tyrosinase utilisée dans ce transgène contient des éléments de type S/MAR ainsi que des régions d'hypersensibilité à la DNase. Ces éléments confèrent au transgène une régulation de l'expression qui est dite dépendante du nombre de copie et indépendante du site d'intégration. Afin de vérifier cette corrélation spécifiquement au niveau des mélanocytes, l'expression du transgène a été analysée par RT-PCR semi-quantitatif avec de l'ARN isolés des cellules de la couche basale de l'épiderme des quatre lignées de souris transgéniques TYR-gl. En normalisant l'intensité de la bande transgénique par rapport à la bande endogène dans la section linéaire du PCR, on peut évaluer le niveau d'expression du transgène. Ainsi, on observe que le niveau d'expression du transgène augmente proportionnellement et de façon linéaire en fonction du nombre de copies du transgène intégrées dans les différentes lignées transgéniques (Figure 27B). L'expression du gène de la β -actine demeure équivalente entre les différentes lignées de transgéniques. De plus, on peut noter que le niveau d'expression du transgène est supérieur (surexpression) à celui de l'endogène *gl* dans le cas des lignées #478 et #483 (Figure 27B).

5. Complémentation phénotypique

5.1 Croisements F2

Des souris F₁ transgéniques hétérozygotes *gl/+* issues de chacune des fondatrices ont à nouveau été croisées avec des souris hétérozygotes *gl/+* afin de générer des souris homozygotes *gl/gl* transgéniques (Chapitre 2 : Figure 25). Tout comme pour les croisements précédents, la progéniture (F₂) a été analysée par PCR pour la présence du transgène pTYR-*gl* et pour le génotype *gl*. Les souris transgéniques *gl/gl* issues de ces croisements ont été analysées pour une complémentation phénotypique.

5.2 Complémentation phénotypique de la coloration du pelage

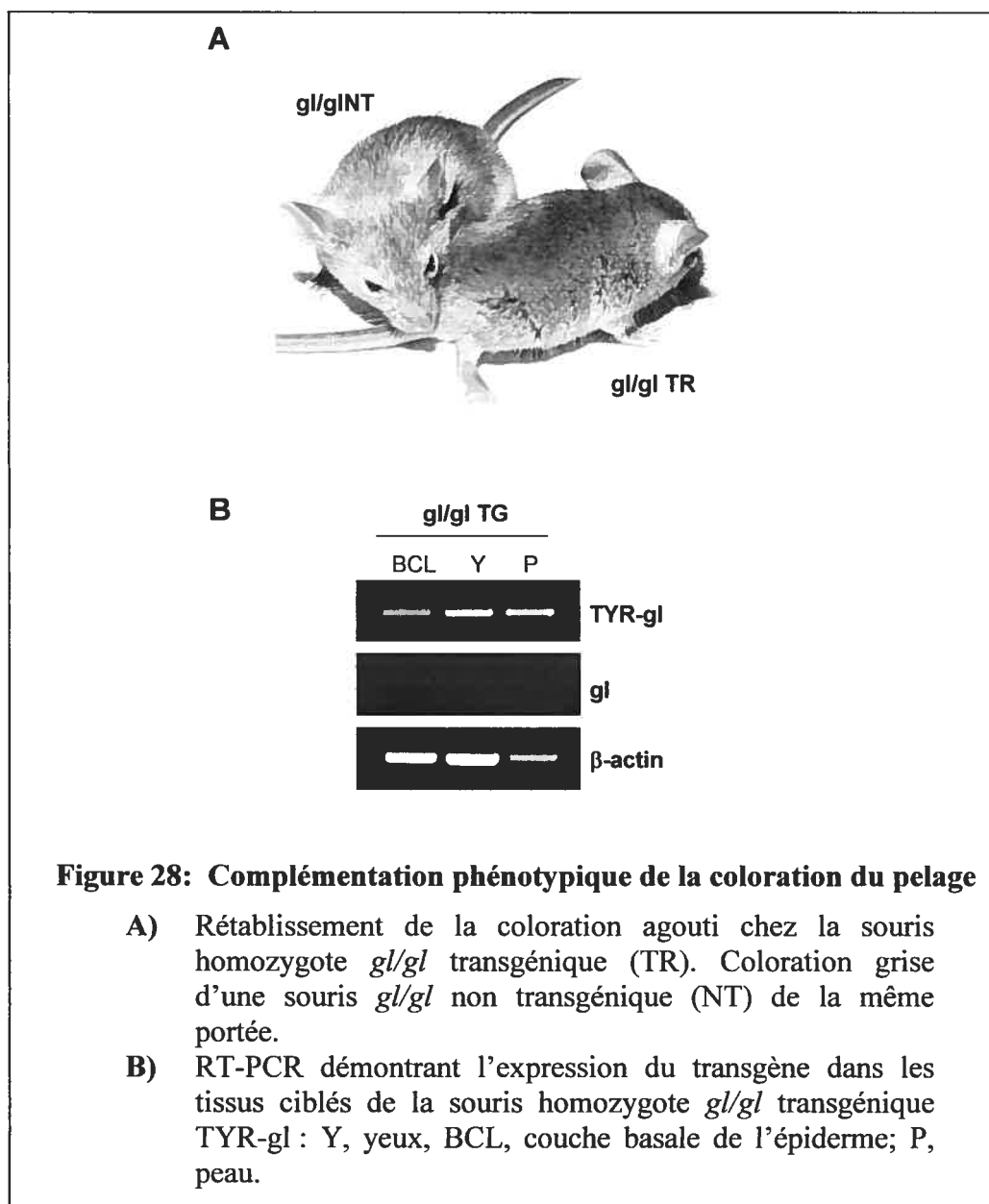
Une complémentation phénotypique de la coloration du pelage devrait être détectée par la génération de souris agouti (au lieu de grise) homozygotes au locus *gl*. Ce fut le cas avec trois lignées, de façon constante toutes les souris *gl/gl* transgéniques présentent désormais une coloration agouti du pelage, comparativement aux souris *gl/gl* non transgéniques dont le pelage demeure gris (Figure 28A). Une analyse plus détaillée a permis de démontrer la présence de phéomélanine (pigment jaune) dans le poil des souris *gl/gl* transgéniques, alors que ce pigment n'est pas détectable chez la souris *gl/gl* non transgénique. De plus, l'expression du transgène TYR-*gl* a été analysée par RT-PCR avec des ARNs isolés de divers tissus d'une souris *gl/gl* transgénique agouti, afin de corrélérer

l'expression du transgène et la restauration d'un phénotype sauvage. On note que le transcrit transgénique demeure présent dans les tissus ciblés tels que la peau, les yeux et la couche basale de l'épiderme (Figure 28B). L'expression du gène endogène *gl* est absente dans ces tissus chez la souris homozygote *gl/gl* non transgénique. La complémentation phénotypique du pelage a été observée chez trois des quatre lignées transgéniques TYR-*gl* : les lignées #438, #475 et #483. Jusqu'à maintenant, aucune souris *gl/gl* transgénique n'a été obtenue dans la lignée #478, d'où l'impossibilité de vérifier la complémentation dans cette lignée.

5.3 Phénotype ostéopérotique

Le phénotype osseux a également été analysé chez les souris homozygotes transgéniques des différentes lignées TYR-*gl*. Tel qu'il était attendu, aucune complémentation phénotypique de l'ostéopétrose n'a été observée chez les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques. En effet, une radiographie permet clairement de caractériser le phénotype ostéopérotique associé avec une densité osseuse accrue chez une souris homozygote *gl/gl* non transgénique (Figure 29A). En comparaison avec une souris sauvage contrôle, le phénotype ostéopérotique est toujours présent chez les souris *gl/gl* transgéniques (Figure 29A). Une analyse plus détaillée au niveau de l'histologie de ces mêmes souris transgéniques confirme le phénotype ostéopérotique (Figure 29B). Chez ces souris, il y a une accumulation anormale de tissus osseux et une l'absence de la cavité médullaire. Au niveau de la diaphyse, on peut noter chez ces souris une accumulation d'os trabéculaire remplaçant en

grande partie le tissu hématopoïétique présent dans les os longs. Il est à noter que le phénotype osseux observé est identique à celui décrit chez la souris homozygote *gl/gl* non transgénique. De plus, les souris *gl/gl* transgéniques présentent toutes les autres caractéristiques phénotypiques de la souris *grey-lethal* à savoir l'absence d'éruption des dents et une mort précoce aux environs de 3 semaines.



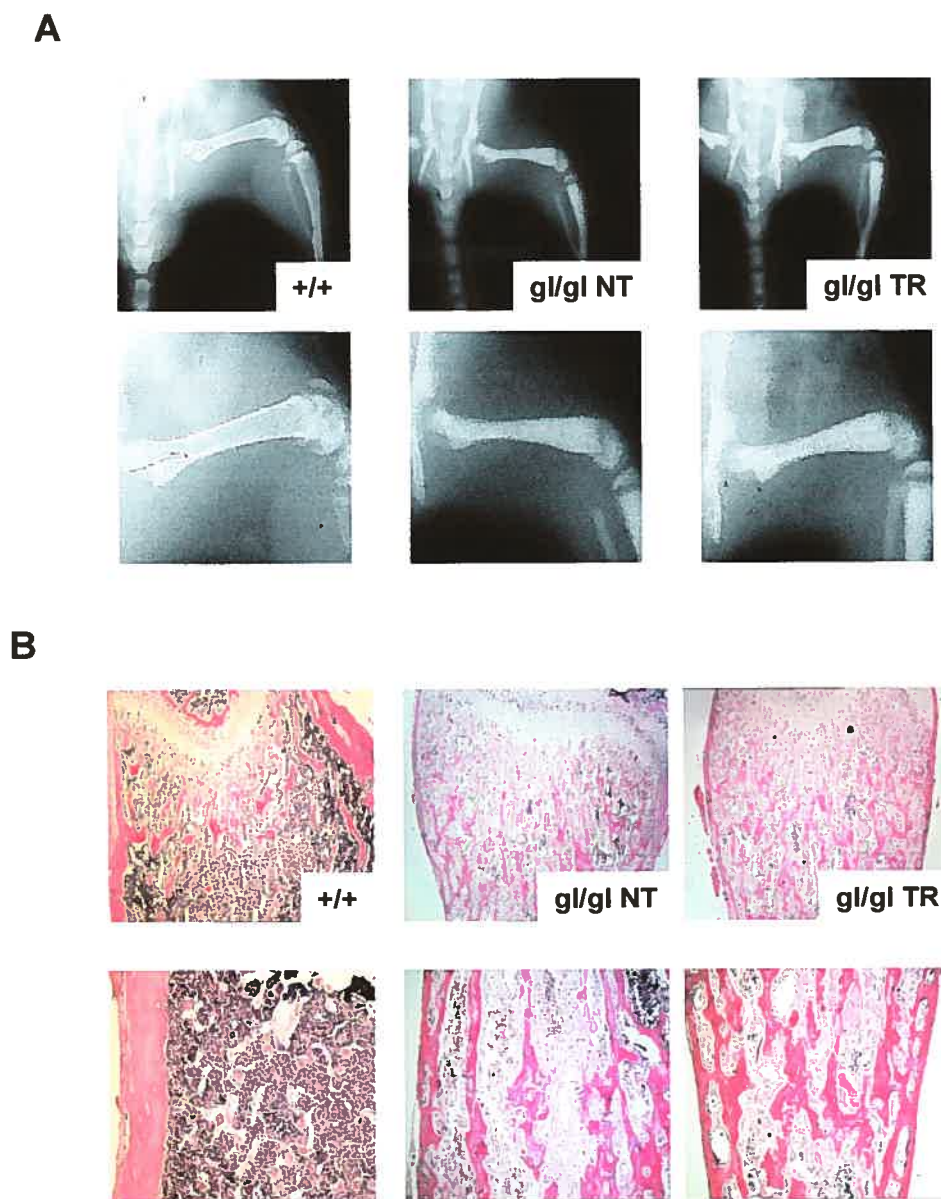


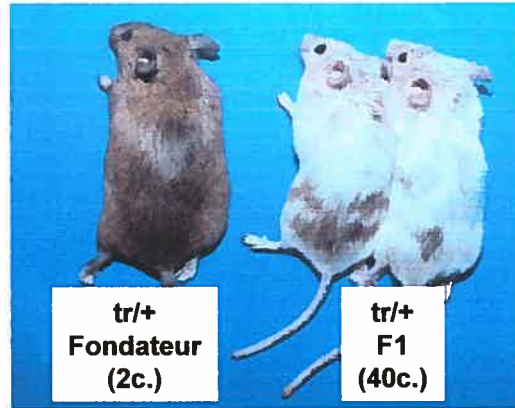
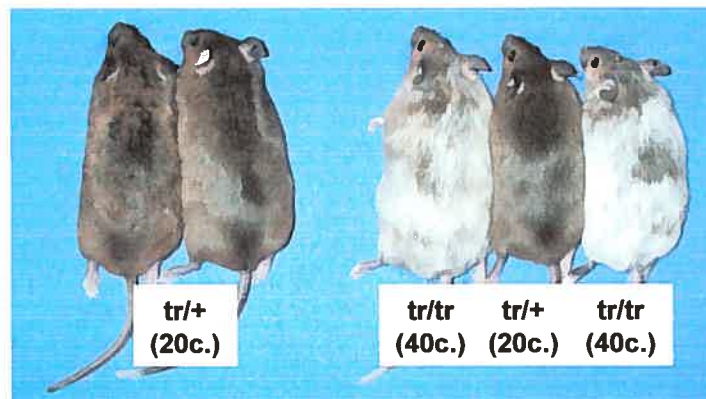
Figure 29: Phénotype ostéopétritique des souris TYR-gl.

- A)** Radiographies des membres postérieurs (haut) des souris TYR-gl : *gl/gl* transgénique (TR), *gl/gl* non transgénique (NT) et *+/+* non transgénique contrôle. Grossissement au niveau du fémur (bas).
- B)** Coloration hématoxyline/éosine de coupes de fémurs isolés des mêmes animaux. Microscopie optique au niveau de l'épiphyse (5X) (haut) et au niveau de la diaphyse (10X) (bas).

6. Nouveau phénotype de pelage

6.1 Dilution de la coloration du pelage des souris TYR-gl

Parmi les lignées transgéniques TYR-gl, les lignées #478 et #483 ont une intégration en tandem de plus de 20 et 40 copies du transgène respectivement. Tel que démontré, la séquence de régulation distale à -15 Kb du promoteur de la tyrosinase attribue un niveau d'expression qui est dépendant du nombre de copie. Ainsi, ces deux lignées présentent un niveau d'expression du transgène qui semble supérieur à celui de l'endogène *gl* (Figure 27B). La lignée #483, contenant plus de 40 copies du transgène, présente un phénotype particulier au niveau de la coloration du pelage (Figure 30A). Ce nouveau phénotype a également été reproduit chez la lignée #478 lorsque le transgène est à l'état homozygote, soit plus de 40 copies (Figure 30A). En effet, on peut observer chez les deux lignées une dilution générale de la couleur du pelage, même si certaines régions du pelage demeurent encore de coloration agouti. Une analyse plus détaillée des poils des deux lignées démontre une distribution anormale des pigments à travers le poil des souris transgéniques (Figure 31A-B). Dans un même poil, on peut observer de multiples segments de déposition de pigment noir où s'intercalent des régions complètement dépourvues de pigmentation (Figure 31A-B). De plus, on note l'absence dans ces régions de pigment jaune normalement présent dans le poil agouti d'une souris contrôle (Figure 31C).

A**Lignée #483****B****Lignée #478****Figure 30: Nouveau phénotype de la coloration du pelage**

- A) Apparition d'une coloration diluée du pelage de la progéniture de la souris fondatrice #483. La souris fondatrice (chimère) possédant 2 copies du transgène est agouti. La progéniture F_1 possède plus de 40 copies du transgène et montre une dilution de la coloration du poil.
- B) Dilution de la coloration du pelage de la progéniture de la lignée #478. À gauche phénotype parental (F_1) agouti (20 copies). La progéniture hétérozygote $tr/+$ (20 copies) est agouti alors que les souris homozygotes tr/tr (40 copies) montrent une dilution de la coloration du poil.

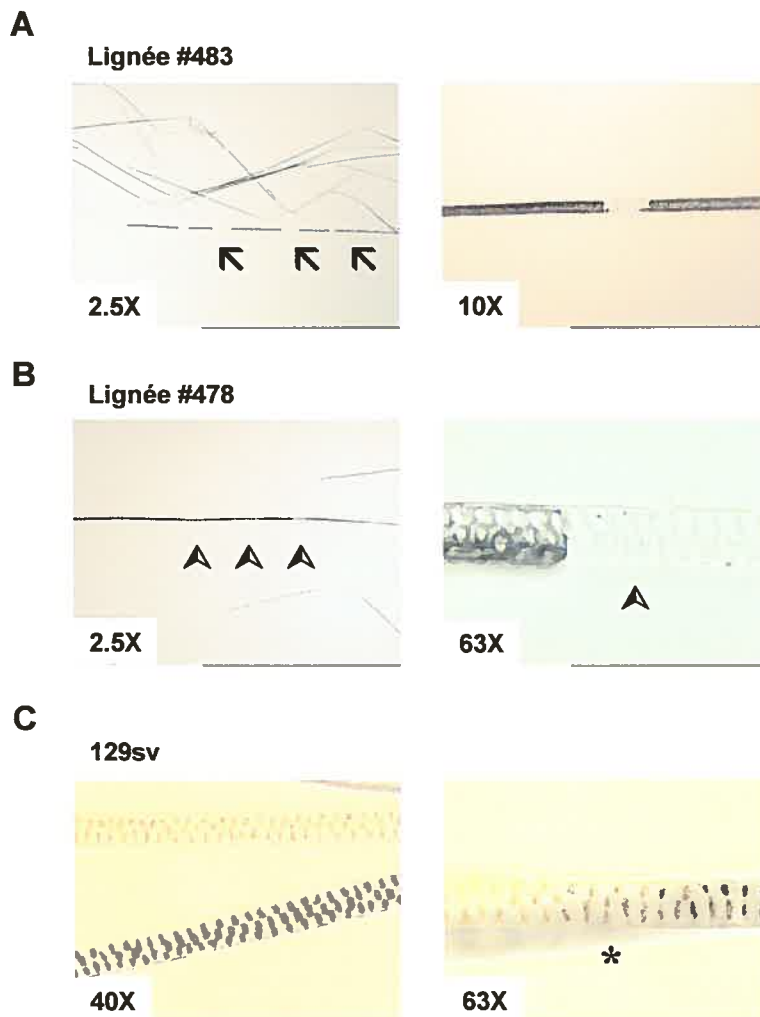


Figure 31: Distribution des pigments au niveau du pelage

- A) Distribution anormale du pigment noir dans le poil des souris TYR-gl de la lignée #483 présentant un phénotype de dilution de la coloration. Présence de multiples segments de déposition d'eumélanine (pigment noir) (↖) dans un même poil et absence de phéomélanine (pigment jaune).
- B) Distribution anormale du pigment noir chez le poil des souris TYR-gl de la lignée #478 présentant un phénotype de la coloration non agouti. Présence de segments complètement dépourvus de pigmentation (▲)
- C) Présence de phéomélanine et d'eumélanine dans le poil d'une souris fondatrice agouti contrôle. À droite, transition entre la déposition des deux pigments dans un même poil (*).

SECTION B : Ostéopétrose

7. Transgène spécifique aux ostéoclastes

La complémentation phénotypique de l'ostéopétrose chez la souris *gl* a été mise en œuvre en ciblant spécifiquement l'expression du gène *gl* aux ostéoclastes en utilisant le promoteur de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP).

7.1 Construction pTRAP-gl

Le promoteur murin de l'enzyme phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) a été utilisé afin de cibler l'expression du gène *gl* spécifiquement aux ostéoclastes. Le promoteur utilisé contient un fragment de 1300 pb correspondant à la région régulatrice proximale en plus du premier exon et intron non traduits du gène TRAP (Reddy SV. *et al.* 1993). En aval de ce promoteur, on a inséré la séquence codante du gène *gl* et les mêmes séquences stabilisatrices du gène hGH retrouvées dans la construction pTYR-gl. Les séquences procaryotes ont été éliminées de la construction avant la préparation pour la microinjection. Ainsi, une fois la construction linéarisée, ces différents éléments, totalisant 5 Kb (Figure 32A), composent le transgène pTRAP-gl.

8. Production et caractérisation de souris fondatrices TRAP-gl

8.1 Identification des souris fondatrices TRAP-gl

La construction pTRAP-gl a été microinjectée dans les œufs fertilisés obtenus à partir d'un croisement de souris F₁ (C57BL/6 X C3H) X C57BL/6. Les souris

fondatrices obtenues ont été analysées pour la présence du transgène par une analyse PCR. L'amorce sens TRAP-FOR et antisens HSPC-REV1 encadrent la jonction spécifique au transgène entre le promoteur TRAP et la séquence codante du gène *gl*. Le produit PCR de 500 pb, amplifié à partir de l'ADN génomique des souris fondatrices, est unique aux souris transgéniques (Figure 32B). Par cette approche, quatre souris fondatrices ont été identifiées, #657, #692, #630 et #670 (Figure 32B). L'ADN génomique extrait d'une souris de souche C57BL/6 a été utilisé comme contrôle négatif pour la réaction de PCR. Chacune de ces souris fondatrices a été utilisée afin d'établir des lignées transgéniques.

8.2 Caractérisation des souris fondatrices TRAP-gl

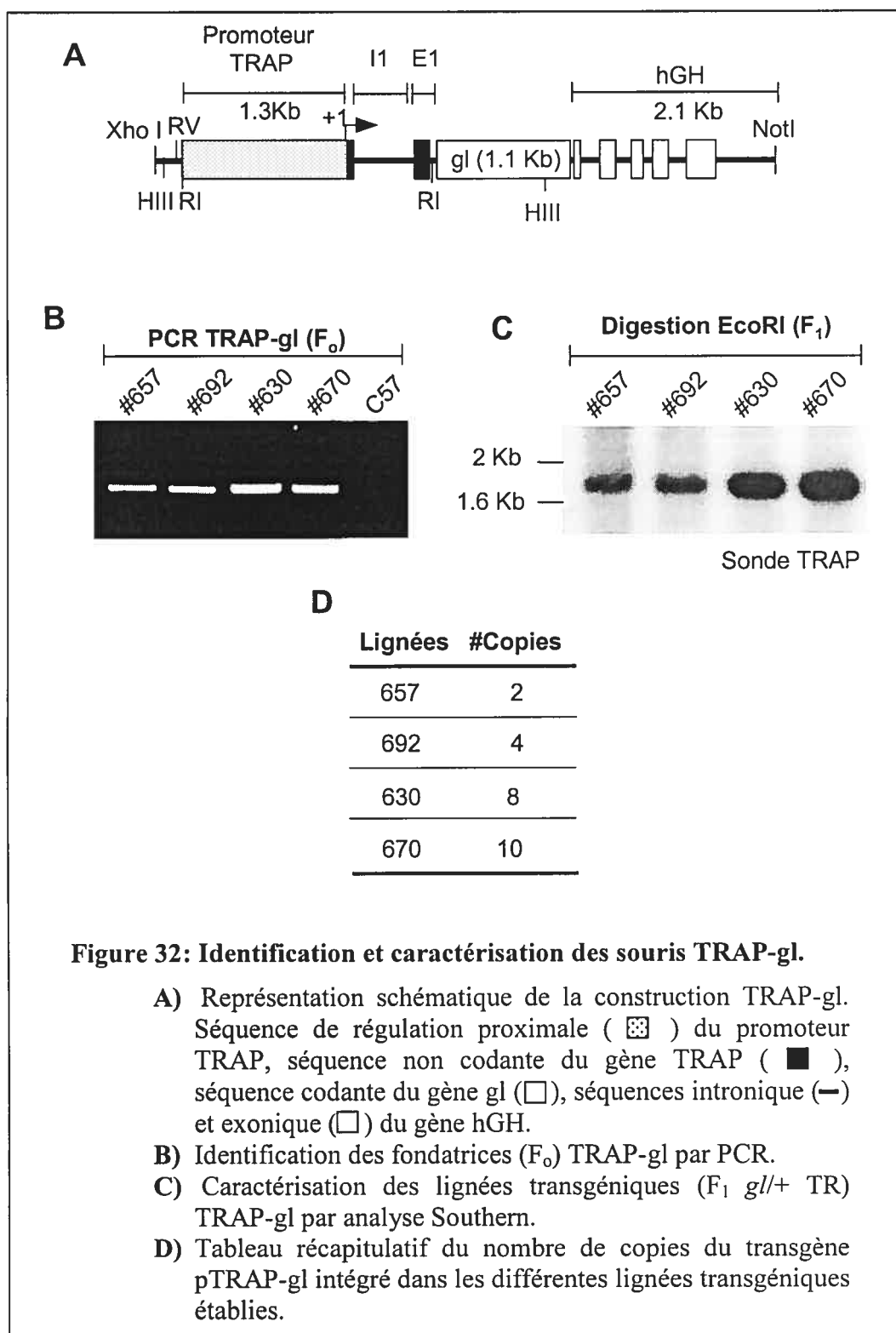
Des analyses de type Southern sur ces quatre fondatrices TRAP-gl ont permis de vérifier l'intégrité génomique du transgène. Une sonde correspondant à la région hGH de la construction a permis d'analyser l'intégrité du transgène en 3' après digestion EcoRV de l'ADN génomique. L'intégrité en 5' a été vérifiée sur les mêmes échantillons avec une sonde localisée dans le promoteur pTRAP. Chez les souris transgéniques, cette sonde révèle un fragment de 1.8 Kb correspondant à la totalité de la région promotrice TRAP (Figure 32C). Le nombre de copies du transgène a également été évalué par une analyse Southern. L'ADN génomique des souris fondatrices TRAP-gl a été digéré par HindIII et le Southern hybridé avec une sonde localisée dans le premier exon du gène *gl*. Cette sonde révèle à la fois un fragment transgénique de 4.9 Kb et un fragment endogène *gl* de 6Kb. La

comparaison entre l'intensité de ces bandes pour une même transgénique permet d'estimer le nombre de copies de transgène intégré. Le nombre de copies du transgène intégré dans les quatre souris fondatrices varie de 2 à 10 (Figure 32D). Une orientation tête-à-queue a également été observée entre les diverses copies de transgène à un site unique d'intégration.

9. Génération de lignées transgéniques TRAP-gl

9.1 Croisements F1

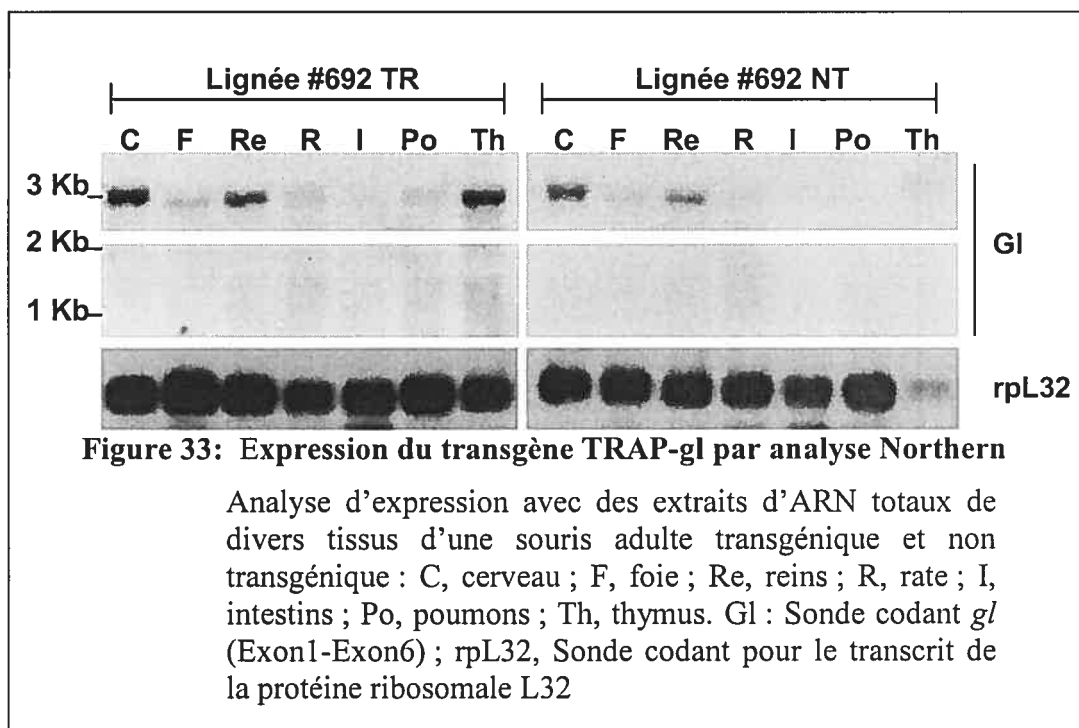
Chacune des souris fondatrices TRAP-gl a été utilisée afin de vérifier la complémentation phénotypique chez les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques. Pour ce faire, des lignées de transgéniques ont été établies en croisant chaque fondatrice avec des souris hétérozygotes *gl/+* (Chapitre 2 : Figure 25). Toutes les souris d'une même lignée transgénique transmettent le même nombre de copies du transgène intégré au même locus chromosomique. Ainsi, la progéniture (F₁) issue de ces divers croisements a été analysée par PCR et par Southern afin de vérifier la présence et l'intégrité du transgène. Aucune variation du nombre de copies et du site d'intégration n'a été observée parmi la progéniture obtenue des diverses lignées TRAP-gl. En plus de vérifier la présence du transgène, les souris ont également été analysées pour le génotype *gl* par PCR. Pour chacune des lignées, les souris transgéniques hétérozygotes *gl/+* ont été utilisées pour des analyses d'expression et des souris hétérozygotes *gl/+* non transgéniques comme contrôles.



10. Caractérisation de l'expression du transgène

10.1 Expression du transgène TRAP-gl

Une analyse Northern a été utilisée pour vérifier l'expression spécifique du transgène TRAP-gl (Figure 33). Pour ce faire les ARNs totaux de divers organes d'une souris hétérozygote *gl/+* transgénique de la lignée #692 âgée de trois semaines et d'une souris hétérozygote *gl/+* non transgénique contrôle ont été isolés. L'expression du transgène a été analysée avec des ARNs préparés à partir du cerveau, du foie, de la rate, du rein, du thymus, des intestins et du poumon. Des quantités équivalentes d'ARN pour chacun des organes ont été séparées sur gel d'agarose dénaturant et transférées sur membrane de nylon. Une sonde correspondant aux cinq derniers exons du gène *gl* révèle un transcrit de 3 Kb correspondant à l'ARN messenger du gène *gl* endogène (Figure 33). Le transcrit transgénique de 2 Kb n'a pas été observé chez les tissus et ce, même après une exposition prolongée (2 semaines) de la membrane de Northern. Des extraits enrichis en ARN messenger (polyA) ont été préparés pour le cerveau, le foie, la rate et les reins et ont également été analysés par Northern. Une sonde correspondant à la partie codante du gène *gl* a permis d'observer le transcrit correspondant au gène *gl* endogène, mais le transcrit transgénique n'a pas été détecté. Une sonde correspondant au gène ubiquitaire *rpL32* a été utilisée comme contrôle interne de l'analyse Northern (Figure 32).



10.2 Expression du transgène TRAP-gl au niveau des OCLs

L'expression du transgène TRAP-gl a été vérifiée plus spécifiquement avec des extraits d'ARN totaux d'OCLs par une approche de RT-PCR (Figure 34). Des ostéoclastes générés *in vitro* ont été préparés à partir de souris hétérozygotes *gl/+* transgéniques de chacune des lignées transgéniques TRAP-gl. Les cultures ont également été effectuées avec des souris contrôles non transgéniques. Une coloration histochimique TRAP permet d'identifier les cellules positives pour TRAP et d'évaluer qualitativement et quantitativement la culture d'OCLs. Pour chacune des lignées transgéniques, des OCLs ont pu être générés *in vitro* à partir de suspensions cellulaires (incluant les précurseurs hématopoïétiques des ostéoclastes) de la moelle osseuse ainsi que de la rate (Figure 34A). Au niveau

cellulaire, aucune différence morphologique ou quantitative importante n'a été observée en comparant les OCLs obtenus à partir des souris transgéniques ou contrôles non transgéniques (Figure 34A). L'ARN total extrait de ces OCLs a été utilisé pour évaluer l'expression du transgène par RT-PCR. Les amorces sens HSPCEx3-FOR et antisens hGHE2/3-REV choisies permettent d'amplifier spécifiquement le messenger transgénique puisque l'amorce antisens chevauche à la fois l'exon 3 et l'exon 2 du gène hGH présent uniquement dans le transgène épissé. Si un contaminant d'ADN génomique est présent dans ces préparations d'ARN, celui-ci ne sera pas amplifié lors de la réaction de PCR. Ainsi, une analyse RT-PCR a permis de détecter le transcrit transgénique dans les OCLs obtenus à partir de chacune des lignées TRAP-gl (Figure 34B). On peut également observer, en plus de la bande attendue de 500 pb, une bande de plus haut poids moléculaire chez les OCLs issus des souris transgéniques. Ce produit d'amplification correspond à une forme non épissée du premier intron hGH du transcrit transgénique. Il est à noter que le niveau d'expression du transgène est variable selon la lignée et semble être proportionnel au nombre de copies du transgène. L'expression du transgène chez la lignée #657 est relativement faible et ne peut être visualisée qu'après hybridation des produits d'amplification RT-PCR avec une sonde radioactive. De plus, les niveaux d'expression des endogènes *gl* et TRAP demeurent constants dans les OCLs obtenus à partir des différentes lignées TRAP-gl indépendamment de la présence et du nombre de copies du transgène (Figure

34B). L'expression du gène de la β -actine est utilisée comme contrôle quantitatif et qualitatif de l'expérience de RT-PCR.

11. Complémentation phénotypique

11.1 Croisements F2

Des souris F₁ transgéniques hétérozygotes *gl/+* ont à nouveau été croisées avec des souris hétérozygotes *gl/+* afin de générer des souris homozygotes *gl/gl* transgéniques (Chapitre 2 : Figure 25). Tout comme pour les croisements précédents, la progéniture (F₂) a été analysée par PCR pour la présence du transgène TRAP-*gl* ainsi que pour le génotype *gl*. Les souris transgéniques *gl/gl* issues de ces croisements ont été analysées pour une complémentation phénotypique.

11.2 Complémentation du phénotype ostéopérotique

La complémentation du phénotype osseux a été évaluée chez les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques des différentes lignées TRAP-*gl*. Parmi les souris *gl/gl* transgéniques générées à partir des différentes lignées, aucune complémentation de l'ostéopérose n'a pu être observée. Des analyses radiologiques des membres postérieurs permettent de visualiser la densité osseuse accrue chez la souris homozygote *gl/gl* transgénique comparativement à la souris

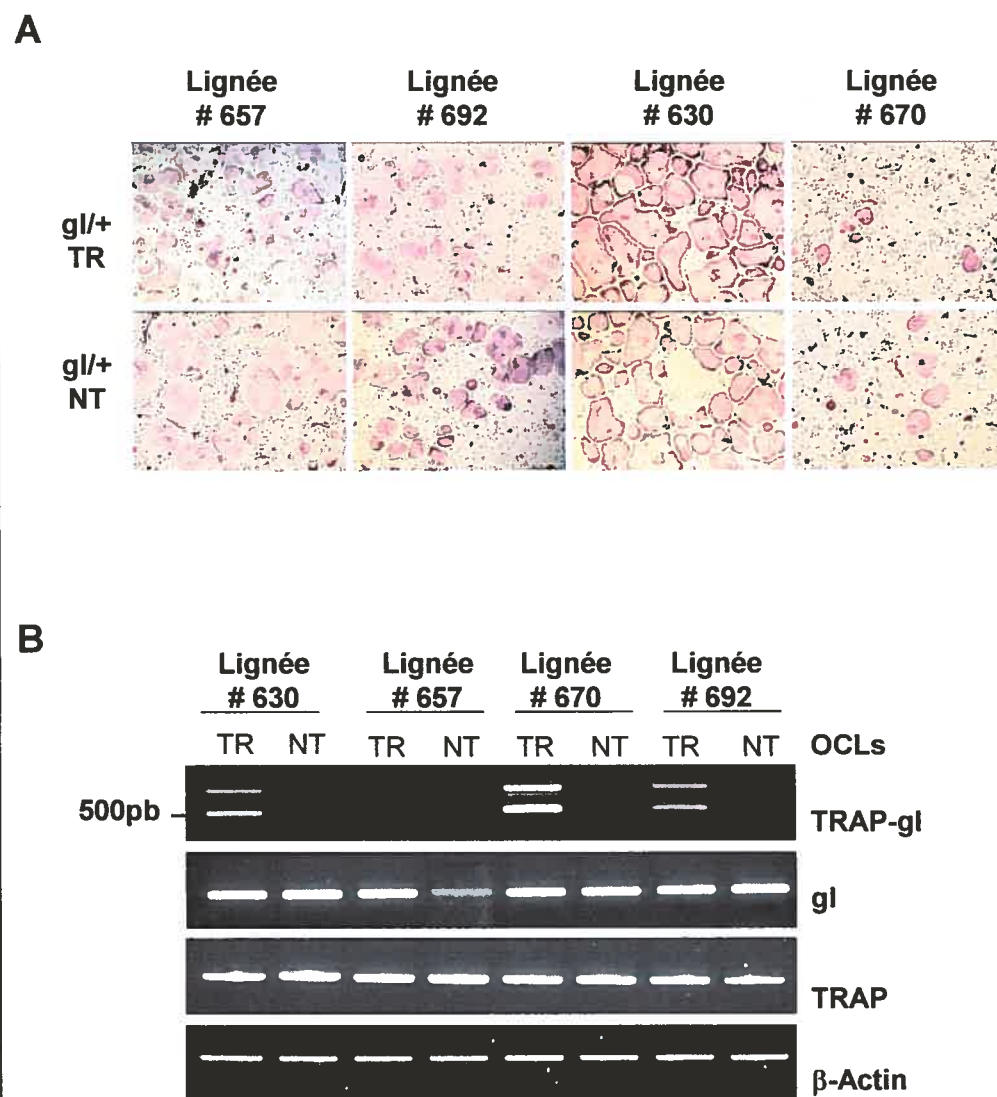


Figure 34: Expression du transgène TRAP-gl dans les ostéoclastes

- A) Coloration TRAP d'OCLs générés en culture (6jours) avec des cellules de moelle osseuse de souris *gI/+* transgéniques (TR) et non transgéniques (NT) des quatre lignées TRAP-gl. Microscopie optique grossissement 2,5X.
- B) RT-PCR avec des extraits d'ARN totaux d'OCLs de souris *gI/+* transgéniques (TR) et non transgéniques (NT) de chacune des lignées TRAP-gl.

contrôle sauvage (Figure 35A). Une analyse histologique plus détaillée des coupes d'os de ces mêmes souris transgéniques démontre bien la persistance du phénotype ostéopétrotique (Figure 35B) avec une accumulation anormale de tissu osseux et un faible développement de la cavité médullaire. Au niveau de la diaphyse, on peut noter, chez les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques, une accumulation d'os trabéculaire remplaçant en grande partie le tissu hématopoïétique présent dans les os longs. Il est à noter que ce phénotype osseux est identique à celui observé chez la souris homozygote *gl/gl* non transgénique. De plus, les souris *gl/gl* TRAP-*gl* transgéniques présentent toutes les caractéristiques phénotypiques de la souris *grey-lethal* avec une absence de l'éruption des dents ainsi qu'une mort précoce à l'âge de 3 semaines.

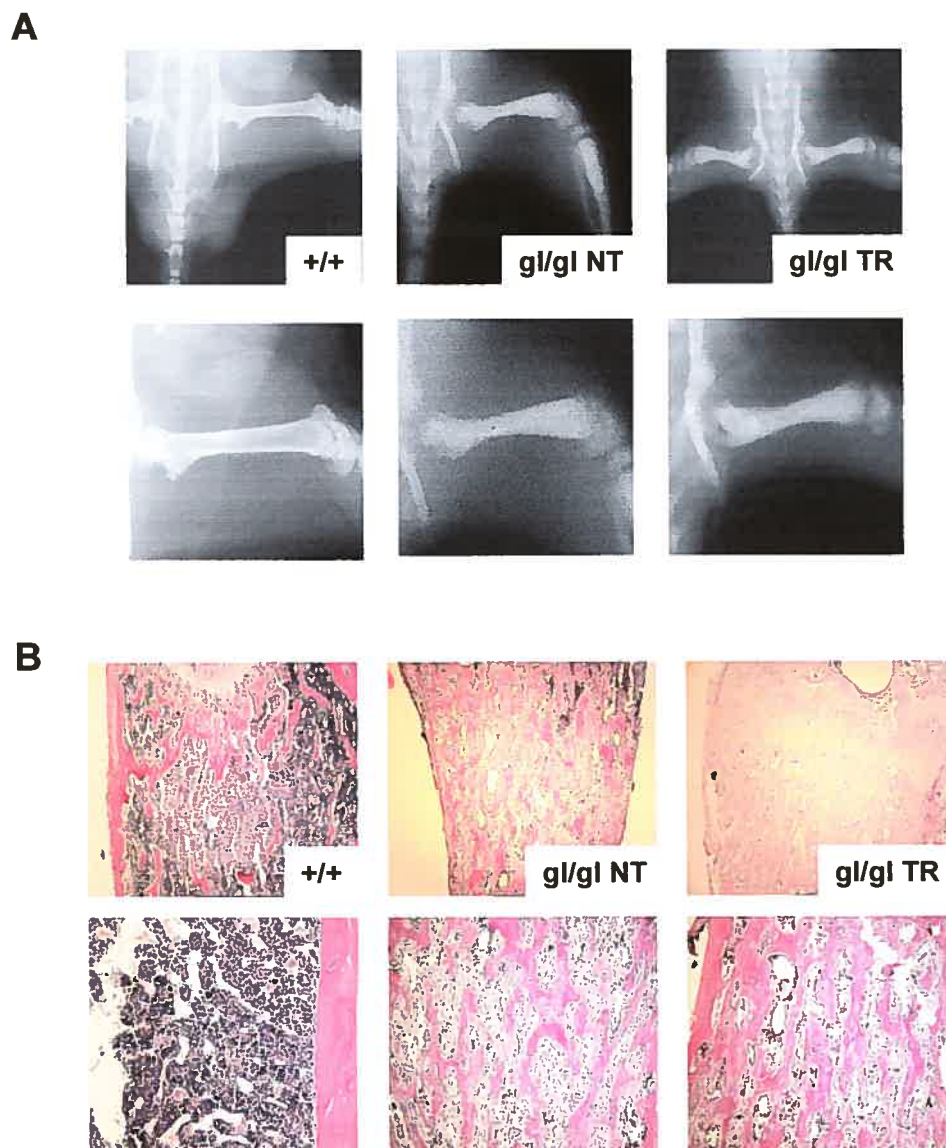


Figure 35 : Phénotype ostéopétrotique des souris TRAP-gl.

- A)** Radiographies des membres postérieurs (haut) des souris TRAP-gl : *gl/gl* transgénique (TR), *gl/gl* non transgénique (NT) et *+/+* non transgénique contrôle. Grossissement au niveau du fémur (bas).
- B)** Coloration hématoxyline/éosine de coupes de fémurs isolés des mêmes animaux. Microscopie optique au niveau de l'épiphyse (5X) (haut) et au niveau de la diaphyse (10X) (bas).

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

1. La souris grey-lethal

L'ostéopétrose est une maladie génétique rare caractérisée par une accumulation anormale de tissu osseux. Cette pathologie est associée à un défaut de l'activité de résorption de cellules osseuses spécialisées, les ostéoclastes. L'utilisation de modèles animaux d'ostéopétrose a permis d'étudier et de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans cette maladie. La souris grey-lethal (*gl*) est un modèle établi de l'ostéopétrose autosomale récessive. Cette mutation se traduit par une accumulation anormale de tissu osseux avec un faible développement de la cavité médullaire, une mort précoce et une complémentation fonctionnelle après transfert de moelle osseuse. De plus, cette mutation produit également un défaut au niveau de la coloration du pelage.

Le gène *gl* a récemment été identifié par une approche de clonage positionnel. La mutation qui affecte ce gène a été identifiée et consiste en une délétion qui abolit l'expression du gène chez la souris homozygote mutante. Une approche de complémentation fonctionnelle *in vivo* dans des souris transgéniques BAC a permis de démontrer le rétablissement des deux phénotypes majeurs (ostéopétrose et coloration du pelage) (Chalhoub N. *et al.* 2004). Les travaux de notre laboratoire ont démontré que la protéine *gl* est essentielle à la fonction et à la maturation des ostéoclastes, mais également des mélanocytes. Le rôle de cette protéine dans chacun de ces types cellulaires n'est pas encore déterminé.

Ainsi, l'objectif principal de mon projet a été de déterminer, plus précisément, le rôle *in vivo* du gène grey-lethal (*gl*) dans la maladie ostéopétrique ainsi que dans le déficit de la coloration du poil. Pour ce faire, une approche de complémentation fonctionnelle ciblée aux ostéoclastes et aux mélanocytes dans les souris transgéniques a été adoptée.

2. Phénotype de la coloration du pelage chez la souris grey-lethal

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées productrices de pigments impliqués dans la coloration de la peau ainsi que des poils. Deux pigments sont synthétisés au niveau des mélanosomes : l'eumélanine (pigment noir) et la phéomélanine (pigment jaune). La pigmentation du poil chez la souris est un processus comportant plusieurs étapes impliquant la synthèse des pigments dans les mélanosomes au niveau des mélanocytes, le transport de ces mélanosomes vers les projections dendritiques des mélanocytes et le transfert des mélanosomes dans les kératinocytes avoisinants. Plusieurs mutations produisant un défaut de la coloration du pelage ont été identifiées chez la souris. Ces mutations affectent des protéines essentielles à la synthèse et/ou à la distribution cellulaire des mélanosomes démontrant ainsi l'importance de ces dernières étapes.

La souris grey-lethal présente un défaut de la coloration du pelage. L'homozygote *gl/gl* est de couleur grise se distinguant des souris sauvages ou hétérozygotes pour l'allèle *gl* qui sont *agouti*. Ce phénotype peut être le résultat d'un défaut de la

synthèse ou du transport de la phéomélanine (pigment jaune) produit par les mélanocytes. Or, des analyses ont démontré que la phéomélanine (pigment jaune) et l'eumélanine (pigment noir) sont synthétisées par les mélanocytes *gl* mais que la distribution du pigment jaune semble altérée (Grüneberg, H. 1935). En effet, le pigment jaune synthétisé forme des agrégats et demeure dans le mélanocyte à la base du follicule pileux. Ainsi, le gène *gl* semble plutôt jouer un rôle essentiel dans l'étape de transport ou de sécrétion du pigment jaune au niveau des mélanocytes.

3. Transgénèse ciblée aux mélanocytes

Afin de vérifier la fonction du gène *gl* dans le transport/sécrétion de la phéomélanine, une approche de complémentation fonctionnelle *in vivo* du phénotype de la coloration du poil chez la souris grey-lethal a été utilisée. Pour ce faire, l'expression de *gl* a été ciblée aux mélanocytes dans les souris transgéniques TYR-*gl* par le promoteur de la tyrosinase.

La tyrosinase est l'enzyme clef dans la biogenèse des mélanines et est donc exprimée dans tous les mélanocytes de la peau ainsi que dans les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine. Des études de transgénèses ont permis de définir la séquence ainsi que la spécificité cellulaire de la région promotrice du gène de la tyrosinase (Kluppel M. *et al.* 1991). De plus, un élément régulateur, constitué d'un site d'hypersensibilité à la DNase et une région S/MAR, a

également été identifié dans la région distale (-15Kb du site d'initiation) du gène de la tyrosinase (Porter SD. *et al.* 1999). En transgénèse, ces éléments régulateurs, utilisés conjointement avec le promoteur proximal de la tyrosinase, confèrent une régulation de l'expression du transgène spécifique aux mélanocytes qui est, en plus, dépendante du nombre de copie et indépendante du site d'intégration (Porter SD. *et al.* 1994).

Ainsi, le promoteur utilisé dans la construction transgénique TYR-*gl* contient la séquence d'activation distale ainsi que le promoteur proximal du gène de la tyrosinase. Ces séquences permettront d'induire l'expression du gène *gl* spécifiquement dans les mélanocytes. Pour ce faire, j'ai utilisé la région codante du gène *gl* qui est de taille plus petite que la séquence génomique du gène *gl*, ce dernier ayant 25 Kb. De plus, la séquence complète du gène humain de l'hormone de croissance (hGH), incluant les cinq exons et introns ainsi que le site de polyadénylation, a été ajoutée afin de stabiliser le transcrit transgénique. Quatre lignées transgéniques ont donc été établies avec le transgène TYR-*gl*. De plus, chaque lignée a intégré un nombre différent de copies du transgène variant de 2 à plus de 40 copies. Puisque le niveau d'expression du transgène est dépendant du nombre de copies intégrées, certaines de ces lignées vont surexprimer le gène *gl*. Ainsi, il sera intéressant d'investiguer, chez ces souris transgéniques, le rôle moléculaire du gène *gl* au niveau des mélanocytes.

Tel qu'attendu, le promoteur de la tyrosinase induit l'expression du transgène dans les mélanocytes de la peau ainsi qu'au niveau de l'épithélium pigmenté de la rétine. Ce patron d'expression diffère de l'expression ubiquiste du gène *gl* endogène, permettant ainsi d'analyser la fonction du transgène spécifiquement dans ces deux types cellulaires. De plus, le niveau d'expression du transgène augmente proportionnellement et de façon linéaire en fonction du nombre de copies du transgène intégré. Cette observation confirme ainsi les propriétés de la région régulatrice ainsi que la spécificité du promoteur de la tyrosinase décrite ci-haut.

4. Complémentation phénotypique de la coloration du pelage

Afin de vérifier la complémentation phénotypique de la coloration du pelage, des souris transgéniques homozygotes au locus *gl* ont été générées pour chacune des lignées établies. Les souris homozygotes *gl/gl* transgéniques présentaient désormais une coloration *agouti* comparativement aux souris homozygotes *gl/gl* non transgéniques qui demeurent grises. Comparativement aux poils gris de la souris *gl/gl* non transgénique, on retrouve, dans les poils de la souris *gl/gl* transgénique, une bande centrale jaune caractéristique d'une coloration *agouti*. Ainsi, le gène *gl* est essentiel au transport et/ou à la sécrétion de la phéomélanine spécifiquement au niveau des mélanocytes. De plus, ces résultats démontrent que le défaut est intrinsèque aux mélanocytes, éliminant la possibilité qu'un défaut au niveau des kératinocytes serait à l'origine du phénotype observé chez la souris

grey-lethal. Ainsi, l'approche de complémentation phénotypique a permis de démontrer clairement le rôle essentiel du gène *gl* dans le transport/sécrétion des phéomélanosomes dans les mélanocytes.

Tel qu'attendu, les souris transgéniques TYR-*gl* homozygotes *gl/gl* présentent toujours l'autre phénotype majeur de la souris grey-lethal. En effet, ces souris demeurent ostéopérotiques et meurent à l'âge de trois semaines. De plus, des analyses histologiques et morphologiques démontrent bien la persistance du phénotype ostéopérotique chez les souris *gl/gl* transgéniques TYR-*gl*.

5. Dilution de la coloration du pelage des souris TYR-*gl*

Un nouveau phénotype a été observé chez deux lignées transgéniques TYR-*gl*. En effet, on observe chez ces souris transgéniques une dilution générale de la couleur du pelage. Chez une souris sauvage, la coloration *agouti* du poil résulte de la formation d'un poil strié où on retrouve une bande apicale noire, une bande centrale jaune et une bande basale noire. Or, chez ces lignées transgéniques, les poils présentent une distribution anormale des pigments. En effet, on retrouve dans un même poil de multiples segments de déposition de pigment noir (au lieu de 2) où s'intercalent des régions complètement dépourvues de pigmentation. De plus, on note également l'absence du pigment jaune normalement présent dans le poil d'une souris *agouti*. Ce phénotype est différent de celui observé chez les poils de

la souris grey-lethal où les pigments noirs sont adéquatement distribués et seule la bande centrale jaune est dépourvue de pigment.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la dilution de la coloration du pelage observée chez ces souris (Appendice I). Diverses approches ont été entreprises afin de vérifier ces nouvelles hypothèses.

5.1 Mutation d'insertion

Quoique très peut probable, une mutation d'insertion pourrait être à l'origine du phénotype observé. En effet, la production de souris transgéniques résulte de l'insertion d'un fragment d'ADN exogène à un site génomique aléatoire. Cette insertion peut survenir à l'intérieur d'un locus et perturber la régulation de ce dernier menant à l'apparition d'un nouveau phénotype. Il est à noter que plusieurs nouveaux gènes ont été identifiés chez la souris grâce à la caractérisation des mutants d'insertions (Rijkers T. *et al.* 1994). Ainsi, la dilution de la couleur du pelage observée chez les souris transgéniques TYR-gl pourrait être le résultat d'une mutation d'insertion. Par contre, il est très improbable de retrouver chez deux lignées transgéniques le même site d'insertion. On peut ainsi supposer que le défaut de coloration résulte d'un effet direct du transgène plutôt que d'une mutation d'insertion. Tout de même, l'identification du site d'insertion (jonction génomique) du transgène TYR-gl dans ces deux lignées est en cours et permettra de valider cette hypothèse.

5.2 Surexpression de Gl : Séquestration de partenaires protéiques

Des analyses Southern ont démontré que ces deux lignées ont une intégration en tandem de plus de 40 copies du transgène. Le promoteur utilisé dans la présente étude contient des séquences régulatrices de type S/MAR qui attribuent un niveau d'expression dépendant du nombre de copie. Des analyses de RT-PCR semi-quantitatif sur des préparations cellulaires de la couche basale de l'épiderme démontrent que le niveau d'expression du transgène est supérieur à celui de l'endogène *gl* chez ces deux lignées transgéniques. Ainsi, la dilution de la couleur du pelage observée chez les souris transgéniques TYR-*gl* pourrait être le résultat d'une surexpression de la protéine Gl au niveau des mélanocytes.

La protéine Gl pourrait jouer un rôle dans le transport/sécrétion des mélanosomes en s'associant avec la membrane des compartiments vésiculaires dans les mélanocytes. Des partenaires protéiques spécifiques également associés aux vésicules de transport/sécrétion pourraient donc interagir avec Gl de manière stœchiométrique. Ainsi, chez la souris *grey-lethal*, l'absence de la protéine Gl induit un défaut du transport/sécrétion des phéomélanosomes, lesquels forment des agrégats intracellulaires entraînant un défaut de la coloration du poil. De même, un niveau très élevé de la protéine Gl pourrait séquestrer des partenaires fonctionnels et induire également une agrégation des phéomélanosomes au niveau des mélanocytes. Ce phénomène pourrait même s'étendre aux eumélanosomes et perturber leur transport/sécrétion. Des analyses de type Western sont

présentement en cours afin de vérifier le niveau de la protéine Gl présent dans les mélanocytes de ces deux lignées transgéniques. De plus, des analyses de microscopie permettraient d'analyser *in vivo* l'état des mélanocytes folliculaires ainsi que de visualiser la présence, dans ces cellules, d'agrégats pigmentés.

5.3 Surexpression de GL : Différenciation et apoptose des mélanocytes

Les mélanocytes folliculaires dérivent de la prolifération et de la différenciation de précurseurs spécifiques, les mélanoblastes. Ces derniers migrent de la crête neurale dans l'épiderme et dans le follicule où ils résident comme cellules souches. Ainsi, à chaque phase de croissance pileuse, ces cellules se différencient en mélanocytes matures capables de synthétiser des pigments. Or, une surexpression du gène *gl* dans ces cellules pourrait mener à un défaut de différenciation ou à une apoptose prématurée des mélanocytes matures dans les follicules. Or, certaines régions du pelage de ces souris présentent encore une coloration agouti (Chapitre 3, Figure 30). L'effet du transgène ne serait donc pas généralisé à toute la population des mélanoblastes, mais aurait plutôt un effet clonal sur certains précurseurs induisant alors la variation de la couleur observée chez ces deux lignées. Par contre, ces hypothèses sont plus difficiles à confirmer et diverses analyses seraient nécessaires afin de mieux comprendre le défaut de coloration des poils observé chez ces deux lignées.

6. Phénotype ostéopérotique de la souris grey-lethal

L'os est un tissu complexe et dynamique dont l'homéostasie repose sur l'équilibre entre la formation et la résorption de la matrice osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées, formées par la fusion cellulaire de précurseurs mononucléés de la famille des monocytes/macrophages, sont responsables de la résorption osseuse. L'ostéoclaste joue ainsi un rôle central dans la formation du squelette et dans la régulation de la masse osseuse. L'ostéopétrose est une maladie génétique caractérisée par l'accumulation anormale de tissus osseux. Plusieurs modèles murins d'ostéopétrose résultent de mutations induites et/ou spontanées affectant des gènes essentiels à la différenciation et/ou l'activation des ostéoclastes. D'ailleurs, la progression de nos connaissances sur l'ostéoclastogénèse et l'homéostasie osseuse est en grande partie le résultat de l'identification et la caractérisation de ces modèles murins.

La souris grey-lethal (*gl*) est le modèle d'étude principal de ce mémoire. La souris *gl* présente une ostéopétrose récessive létale caractérisée par un retard de croissance, une cavité médullaire réduite et l'absence d'éruption des dents. Il a été démontré chez ce modèle de souris que l'ostéopétrose est due à un défaut intrinsèque aux cellules hématopoïétiques d'où proviennent les précurseurs des ostéoclastes. L'ostéopétrose associée à la souris *gl* est donc une ostéopétrose fonctionnelle due à un défaut de résorption, sans que la voie de différenciation des ostéoclastes ne soit affectée. En effet, l'analyse *in vivo* des ostéoclastes présents

sur des coupes d'os de souris *gl/gl* révèle un défaut majeur dans la formation de la bordure plissée, une structure requise pour une résorption efficace de la matrice osseuse. La formation de cette structure membranaire particulière survient lorsque des ostéoclastes multinucléés s'attachent à la matrice osseuse. Ainsi, le gène *gl* semble jouer un rôle au niveau de la résorption osseuse et plus particulièrement dans le développement de la bordure plissée des ostéoclastes qui est associée à des remaniements du cytosquelette.

7. Transgénèse ciblée aux ostéoclastes

Afin de vérifier la fonction du gène *gl* dans l'activité de résorption des ostéoclastes, une approche de complémentation fonctionnelle *in vivo* du phénotype ostéopérotique observé chez la souris grey-lethal a été mise en œuvre. Pour ce faire, l'expression de *gl* a été ciblée aux ostéoclastes dans les souris transgéniques TRAP-*gl* par le promoteur de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP).

La phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) est une métalloenzyme fortement exprimée au niveau des ostéoclastes matures (Reddy SV. *et al.* 1995). Cette enzyme est d'ailleurs un excellent marqueur des ostéoclastes actifs (Minkin C. 1982) et semble être essentielle à la dégradation de la matrice osseuse (Hayman AR. *et al.* 1996). L'expression de cette enzyme débute au niveau des pré-ostéoclastes mononucléés, mais est maximale dans les ostéoclastes multinucléés en résorption active. La séquence régulatrice du gène de la phosphatase acide

résistante au tartrate a été identifiée et bien caractérisée (Reddy SV. *et al.* 1993). La région régulatrice, incluant le premier exon non traduit et le premier intron, a été délimitée par des essais *in vitro* à l'aide d'un gène rapporteur (Reddy SV. *et al.* 1995). De plus, des études *in vivo* ont démontré que cette région régulatrice induit une expression spécifique dans les ostéoclastes chez des souris transgéniques. Ce promoteur a d'ailleurs été utilisé dans une approche de complémentation phénotypique de l'ostéopétrose observée chez la souris Src^{-/-} (Schwartzberg PL. *et al.* 1997). Plus récemment, ce même promoteur a été utilisé pour étudier le rôle, au niveau des ostéoclastes, du gène c-Fos dans la maladie de Paget (Beedles KE. *et al.* 1999).

Ainsi, dans une approche similaire, le promoteur du gène de la phosphatase acide résistante au tartrate a été utilisé dans la construction du transgène TRAP-*gl*. Ce promoteur devrait induire l'expression du gène *gl* spécifiquement au niveau des ostéoclastes matures. Tout comme pour la construction TYR-*gl*, seule la région codante du gène *gl* a été utilisée. La séquence complète du gène humain de l'hormone de croissance (hGH) a également été ajoutée pour stabiliser le transcrit transgénique. Quatre lignées transgéniques ont été établies avec le transgène TRAP-*gl*.

Le patron d'expression tissulaire du transgène TRAP-*gl* a été analysé dans les différentes lignées établies. Les études de transgénèse ultérieures ont démontré que l'utilisation du promoteur TRAP induit un niveau d'expression très élevé dans

les ostéoclastes ainsi qu'à un moindre niveau dans la rate, l'intestin et le thymus. Or, le transcrit transgénique TRAP-*gl* n'a pu être détecté dans ces tissus par analyses Northern. Compte tenu du faible pourcentage de cellules TRAP positives dans les tissus analysés, le niveau d'expression du transgène peut donc être sous le seuil de détection de la technique employée.

Les analyses d'expression du transgène TRAP-*gl* ont donc été effectuées au niveau des ostéoclastes où l'expression devrait être plus élevée. Ainsi, des OCLs ont été générés *in vitro* à partir de chacune des lignées transgéniques TRAP-*gl*. Tel qu'attendu, le transgène est exprimé dans les OCLs de chacune des lignées transgéniques. De plus, ces analyses ont également démontré que le niveau d'expression du transgène est variable et semble être proportionnel au nombre de copies du transgène intégré dans chaque lignée. Il sera donc intéressant de vérifier si cette variation se reflète au niveau de la protéine Gl par des analyses de type Western sur des extraits protéiques d'OCLs de chacune des lignées.

De plus, les analyses de RT-PCR ont révélé la présence d'un produit l'amplification supplémentaire de poids moléculaire plus élevé. Cette bande est spécifique au transgène puisqu'elle est présente dans les OCLs de chacune des lignées transgéniques TRAP-*gl*. Le séquençage de ce produit d'amplification révèle la présence d'un nouveau transcrit transgénique correspondant à une forme non épissée du premier intron hGH. Or, la séquence intronique et exonique incluant le signal de polyadénylation du gène hGH a déjà été utilisée en

transgénèse chez la souris (Ramirez-Solis R. *et al.* 1990., Bawden CS. *et al.* 1995. Trudel M. *et al.* 1997) mais aucune observation d'épissage alternatif n'a été rapportée. Afin de vérifier si cet épissage est unique au transgène TRAP-*gl*, des analyses d'expression ont été effectuées avec les mêmes amorces sur des tissus transgéniques TYR-*gl* dont le transgène contient également la séquence génomique hGH. Ces analyses ont révélé également la présence d'un épissage alternatif du gène hGH chez les tissus transgéniques TYR-*gl*. Ainsi, ce transcrit n'est pas spécifique au transgène TRAP-*gl* mais résulte d'un épissage alternatif du premier intron du gène de l'hormone de croissance humaine lorsqu'il est utilisé en transgénèse chez la souris. Des analyses supplémentaires ont démontré que le reste du transcrit transgénique TRAP-*gl* est intact. Ainsi, l'épissage alternatif du gène hGH induit la formation de deux transcrits sans toutefois affecter la traduction d'une protéine Gl complète puisque la séquence codante du gène *gl* demeure intacte.

Au niveau cellulaire, aucune différence morphologique et quantitative n'a été observée entre les OCLs des souris transgéniques et les OCLs des souris contrôles non transgéniques. Il est à noter que la différence observée entre les cultures ne reflète pas l'effet du transgène, mais résulte plutôt d'une variation expérimentale de la technique de co-culture.

8. Complémentation phénotypique de l'ostéopétrose

Afin de vérifier la complémentation fonctionnelle de l'ostéopétrose, des souris transgéniques homozygotes au locus *gl* ont été générées pour chacune des lignées TRAP-*gl* établies. Or, aucune complémentation de l'ostéopétrose n'a pu être observée chez les souris *gl/gl* transgéniques générées. Une analyse radiologique des membres postérieurs ainsi que l'histologie des coupes d'os de ces souris démontrent la persistance du phénotype ostéopétrotique. Des analyses plus quantitatives de densitométrie osseuse permettraient peut-être de déceler si l'expression du transgène induit une légère amélioration du phénotype ostéopétrotique indécélable au niveau des coupes histologiques.

Des souris transgéniques homozygotes pour le transgène ont également été générées pour chacune des lignées TRAP-*gl* établies. Chez ces souris, on double ainsi le nombre de copies du transgène induisant l'augmentation du niveau d'expression du transgène. Par contre, aucune complémentation du phénotype ostéopétrotique ne fut observée chez les souris homozygotes à la fois pour le locus *gl* et pour le transgène. Ainsi, l'absence de complémentation du phénotype ostéopétrotique ne semble pas être le résultat d'un faible niveau d'expression du transcrit transgénique.

9. Rôle du gène *gl* dans l'homéostasie osseuse

Ce basant sur les observations cellulaires et moléculaires préalablement effectuées, nous avons émis l'hypothèse que le gène *gl* jouait un rôle essentiel dans l'activité de résorption des ostéoclastes (Chalhoub N. et al. 2004, Rajapurohitam V. et al. 2001). Ainsi, le rétablissement de l'expression du gène *gl* dans les ostéoclastes matures devrait corriger le phénotype ostéopérotique. Pour ce faire, l'expression du gène *gl* a été ciblée par transgénèse au niveau des ostéoclastes matures par le promoteur TRAP. L'approche de complémentation fonctionnelle entreprise chez les souris transgéniques TRAP-*gl* n'a donc pas pu définir la fonction du gène *gl* dans l'activité résorptive des ostéoclastes. Par contre, ces résultats demeurent intéressants, remettant ainsi en question l'hypothèse initialement formulée. Deux nouvelles hypothèses ont donc été émises et diverses approches ont été envisagées afin d'expliquer les résultats obtenus.

9.1 Expression du gène *gl* dans un autre type cellulaire : les ostéoblastes

L'homéostasie osseuse résulte d'un équilibre entre la formation et la résorption de la matrice osseuse. Deux types cellulaires, les ostéoclastes et les ostéoblastes jouent un rôle essentiel dans cet équilibre. La dérégulation de l'activité de l'un ou l'autre de ces deux types cellulaires peut mener à un défaut de l'homéostasie osseuse. Notre laboratoire a démontré que le gène *gl* est également exprimé au niveau des ostéoblastes primaires de souris et que son expression est absente dans ce type cellulaire chez la souris grey-lethal (Chalhoub N. et al. 2004). Ces résultats

ont récemment été confirmés par une approche de RT-PCR (APPENDICE II). Le gène *gl* pourrait donc avoir une fonction spécifique dans les ostéoblastes. Or, la souris grey-lethal ne présente aucun défaut majeur dans la formation de la matrice osseuse. De plus, des analyses de transfert de moelle osseuse effectué par Walker en 1975 ont associé l'ostéopétrose observée chez la souris grey-lethal à un défaut intrinsèque aux cellules hématopoïétiques d'où proviennent les précurseurs des ostéoclastes. Donc, le gène *gl* ne semble pas avoir un rôle essentiel dans la formation de la matrice osseuse par les ostéoblastes.

Or, les ostéoblastes sont également impliqués dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes. Afin de vérifier si le gène *gl* intervient dans cette voie, j'ai entrepris des essais de différenciation *in vitro* d'OCLs avec des ostéoblastes primaires provenant d'une souris *gl*. Un essai préliminaire démontre que, comparativement aux ostéoblastes sauvages, l'utilisation des ostéoblastes *gl/gl* dans les co-cultures mène à la différenciation d'un nombre plus restreint d'ostéoclastes (APPENDICE II). Ainsi, le gène *gl* pourrait avoir une fonction spécifique dans la différenciation/activation des ostéoclastes via les ostéoblastes.

Afin de vérifier la fonction du gène *gl* dans l'homéostasie osseuse, nous avons entrepris de cibler l'expression de *gl* aux ostéoblastes dans les souris transgéniques COL-*gl* par le promoteur du gène du pro-collagène (Col α 1). Cette approche permettra de vérifier la fonction du gène *gl* au niveau des ostéoblastes ainsi que de

l'implication de ce type cellulaire dans l'ostéopétrose observée chez la souris grey-lethal. Afin de vérifier la complémentation fonctionnelle de l'ostéopétrose, des souris transgéniques Col-*gl* homozygotes au locus *gl* seront donc générées. De plus, des souris doubles transgéniques Col-*gl* et TRAP-*gl* pourront également être générées afin de vérifier si le gène *gl* est essentiel à la fois au niveau des ostéoblastes et des ostéoclastes. Cette approche a récemment été entamée dans le laboratoire et l'étude de ces souris permettra alors de mieux définir la fonction du gène *gl* dans l'homéostasie osseuse.

9.2 Expression du gène *gl* dans les précurseurs des ostéoclastes

Des analyses d'hybridation *in situ* effectuées au laboratoire ont défini le patron d'expression du gène *gl* durant les premiers stades de développement de la souris (Chalhoub N. *et al.* 2004). Au jour E12,5, l'expression du gène *gl* est détectée au niveau du placenta, du foie foetal et du cerveau. De plus, des analyses d'expression supplémentaires démontrent l'expression précoce du gène *gl* dans le sac vitellin, le foie foetal ainsi qu'au niveau de cellules ES (cellules souche embryonnaires) de souris sauvages (APPENDICE III). Ainsi, le gène *gl* pourrait avoir une fonction plus précoce dans la différenciation des précurseurs des ostéoclastes.

Afin de vérifier la fonction du gène *gl* dans l'homéostasie osseuse, nous avons entrepris de cibler l'expression de *gl* aux précurseurs des ostéoclastes dans les

souris transgéniques PU.1-*gl* en utilisant le promoteur du facteur de transcription PU.1.

Le facteur de transcription PU.1 est un des premiers marqueurs des précurseurs ostéoclastiques. Ce gène est d'ailleurs essentiel à l'ostéoclastogénèse tel que démontré par le phénotype ostéopérotique sévère observé chez la souris PU.1^{-/-} (Tondravi MM. et al. 1997). L'expression du gène PU.1 est restreinte aux cellules hématopoïétiques, son niveau d'expression étant plus élevé dans la lignée myéloïde d'où dérivent les précurseurs des ostéoclastes. La caractérisation *in vitro* du gène PU.1 a révélé la présence d'un promoteur minimal exprimé spécifiquement au niveau des cellules myéloïdes (Chen H. *et al.* 1995, Chen H. *et al.* 1996). De plus, Li *et al.* ont démontré qu'un élément régulateur distal (région à -14 Kb) est essentiel à l'activité de ce promoteur *en vivo* en transgénèse (Li Y. *et al.* 2001).

Ainsi, j'ai choisi d'utiliser le promoteur du gène PU.1 afin de vérifier la fonction du gène *gl* dans la différenciation et l'activité résorptive des ostéoclastes. Une approche de complémentation fonctionnelle *in vivo* du phénotype ostéopérotique observé chez la souris grey-lethal a été mise en œuvre. Cette approche permettra d'exprimer et de vérifier le rôle du gène *gl* dans les précurseurs des ostéoclastes. Pour ce faire, j'ai utilisé une technique de recombinaison homologe (APPENDICE V) dans les bactéries afin de remplacer la séquence génomique du gène PU.1 contenue dans un BAC, obtenue par criblage PCR d'une banque

génomique de souris (APPENDICE V), par la séquence codante du gène *gl* (Gong S. *et al.* 2002) . Il est à noter que le BAC utilisé contient plus de 30 Kb de séquence régulatrice en 5' du gène ainsi que 18 Kb de séquence en 3' afin d'assurer que toutes les séquences requises pour l'expression soient présentes même si elles n'ont pas été toutes caractérisées en détail (APPENDICE V, Figure 1A). De plus, la séquence codant pour la protéine fluorescente verte (GFP : *green fluorescent protein*) a également été insérée dans le BAC, permettant de suivre l'expression du transgène (APPENDICE V, Figure 1E). Ce BAC recombinant a récemment été utilisé pour générer des souris transgéniques. L'expression du transgène PU.1-*gl* a été confirmée par RT-PCR sur des ARNs isolés de la rate des souris des différentes lignées transgéniques générées (APPENDICE V, Figure 2).

Afin de vérifier la complémentation fonctionnelle de l'ostéopétrose, des souris BAC transgéniques homozygotes au locus *gl* ont été générées avec les lignées PU.1-*gl* établies. Des résultats préliminaires démontrent que ce transgène induit une complémentation phénotypique de l'ostéopétrose. En effet, on observe sur coupes d'os de souris *gl/gl* transgéniques PU.1-*gl* une cavité médullaire ainsi qu'une densité osseuse normale (APPENDICE V, Figure 3). Contrairement aux souris *gl/gl* non transgéniques, ces souris montrent une éruption normale des dents et sont de taille comparable aux souris sauvages. Tel qu'attendu, ces souris demeurent grises et survivent au delà de trois semaines. Par contre, elle décèdent prématurément à 7-8 semaines suggérant que l'ostéopétrose n'est pas la cause de la létalité chez la souris grey-lethal. Ainsi, on peut envisager un rôle principal

pour *gl* dans d'autres tissus, tels le cerveau et les reins, où son expression est élevée. Ces souris seront donc essentielles afin de définir la cause primaire de la mort chez la souris *gl/gl*. La caractérisation cellulaire et moléculaire détaillée de ces lignées est présentement en cours. Ces résultats, très intéressants, permettront de mieux définir la fonction du gène *gl* dans l'homéostasie osseuse et dans la différenciation/activation des ostéoclastes.

10. Fonction spéculative du gène *gl*

La souris grey-lethal présente deux phénotypes majeurs : l'ostéopétrose, impliquant un défaut au niveau de la résorption osseuse par les ostéoclastes, et la couleur du poil, impliquant un défaut du transport du pigment jaune dans les mélanocytes. En analysant ces deux phénotypes, il est tentant de spéculer que la protéine Gl ait une fonction commune dans les deux types cellulaires impliqués.

La séquence de l'ADN complémentaire du gène *gl* murin code pour une protéine de 338 acides aminés. L'analyse d'hydrophobicité de la protéine Gl révèle la présence d'un domaine transmembranaire dans la partie carboxy-terminale et d'un peptide signal dans la partie amino-terminale. La structure de la protéine Gl suggère une protéine transmembranaire de type I mais aucun autre motif typique permet de déduire une fonction spécifique. Ainsi, se basant sur ces données et les études d'immunolocalisation effectuées par Chalhoub *et al.* 2004 la protéine Gl serait associée avec la membrane des compartiments intracellulaires.

Dans le cas du phénotype de couleur du poil, le transport de la phéomélanine (pigment jaune) par les mélanosomes dans les mélanocytes semble affecté. Ainsi, on peut spéculer que chez les mélanocytes des souris grey-lethal, une perturbation du trafic vésiculaire des mélanosomes serait à l'origine de l'absence de pigment jaune au niveau des poils. L'approche présentée dans ce mémoire a permis de générer des souris exprimant le gène *gl* spécifiquement dans les mélanocytes. La complémentation phénotypique observée chez les souris *gl/gl* transgéniques démontre clairement le rôle essentiel du gène *gl* dans le transport/sécrétion des phéomélanosomes. L'analyse détaillée de ces souris permettra d'approfondir davantage le rôle du gène grey-lethal dans le transport et la sécrétion des mélanosomes au niveau des mélanocytes.

Des analyses d'immunofluorescence récentes, effectuées sur des ostéoclastes quiescents (APPENDICE IV), suggèrent une localisation vésiculaire de la protéine Gl. De plus, cette protéine est concentrée dans la région périnucléaire des ostéoclastes où est localisé l'appareil de Golgi (APPENDICE IV), l'organelle d'où dérivent les vésicules de transport/sécrétion. Les ostéoclastes *gl* présentent un défaut du développement de la bordure plissée. Or, cette structure est formée par la fusion des vésicules intracellulaires, principalement des lysosomes et des vésicules de sécrétion. Ainsi, un défaut de transport de ces organelles à la membrane apicale pourrait expliquer l'absence de cette structure essentielle à l'activité de résorption des ostéoclastes. Ainsi, la protéine Gl pourrait avoir une

fonction essentielle dans le transport vésiculaire au niveau des ostéoclastes en résorption. De plus, des évidences présentées dans ce mémoire suggèrent que cette fonction est peut-être essentielle au niveau des précurseurs des ostéoclastes.

Ces observations suggèrent que la protéine Gl possède une fonction essentielle au trafic vésiculaire au niveau des mélanocytes et des ostéoclastes. Des essais de co-localisation sont en cours et permettront de confirmer la fonction du gène *gl* au niveau de ces deux types cellulaires. De plus, nous avons récemment identifié des partenaires protéiques potentiels de Gl. La caractérisation moléculaire de ces interactions permettra alors de mieux définir la fonction du gène *gl* dans la maladie ostéopétrotique ainsi que dans le déficit de la coloration du poil chez la souris grey-lethal.

CONCLUSION

La souris grey-lethal (*gl*) représente le modèle idéal pour l'étude de l'ostéopétrose récessive maligne. Le gène *gl* a récemment été identifié et sa mutation se traduit chez la souris par une ostéopétrose sévère et un défaut de la coloration du pelage. L'objectif principal de mon projet a été de déterminer plus précisément le rôle *in vivo* du gène grey-lethal (*gl*) dans la maladie ostéopétrique ainsi que dans le déficit de la coloration du poil.

Pour ce faire, l'expression de *gl* a été ciblée aux mélanocytes dans les souris transgéniques par le promoteur de la tyrosinase. L'obtention d'une complémentation fonctionnelle *in vivo* du phénotype de la coloration du poil a ainsi démontré le rôle essentiel du gène *gl* dans le transport/sécrétion des phéomélanosomes dans les mélanocytes. Dans une approche similaire, l'expression de *gl* a été ciblée aux ostéoclastes dans les souris transgéniques par le promoteur de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP). Bien que cette approche n'ait pu démontrer une complémentation du phénotype ostéopétrique chez les souris homozygotes *gl/gl*, elle ouvre de nouvelles voies à explorer pour définir plus précisément le rôle de *gl* dans la différenciation/maturation de l'ostéoclaste.

Une de ces nouvelles voies a consisté à générer des souris transgéniques exprimant le gène *gl* au niveau des précurseurs des ostéoclastes. Cette approche semble permettre une complémentation fonctionnelle de l'ostéopétrose. La caractérisation cellulaire et moléculaire de ces nouvelles souris transgéniques permettra alors de mieux définir la fonction du gène *gl* dans l'homéostasie osseuse et dans la différenciation/activation des ostéoclastes.

Ainsi, mes études ont permis de démontrer *in vivo* que l'activité du gène *gl* est indispensable aux mécanismes moléculaires requis au transport et à la sécrétion des protéines pigmentaires au niveau des mélanocytes et que l'activité de *gl* est requise à des stades précoces de différenciation de l'ostéoclaste en plus d'un rôle au niveau de l'ostéoclaste mature. La fonction précise du gène *gl* dans chacun de ces types cellulaires n'est pas encore déterminée, mais mes études ont fait progresser nos connaissances et de nombreuses recherches, présentement en cours dans notre laboratoire, aboutiront sans doute à mieux définir le rôle de ce gène au niveau cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

Abboud SL, Woodruff K, Liu C, Shen V, Ghosh-Choudhury N. (2002). Rescue of the osteopetrotic defect in op/op mice by osteoblast-specific targeting of soluble colony-stimulating factor-1. *Endocrinology*. **143**, 1942-1949.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. **390**, 175-179.

Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*. **190**, 1741-1754.

Aubin JE.(2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.*, **2**, 81-94.

Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, Hiebert SW, Stein JL, Stein GS, Lian JB. (1997). Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. *J Cell Biochem.*, **66**, 1-8.

Barber JJ, Townsend D, Olds DP, King RA. (1985). Decreased dopachrome oxidoreductase activity in yellow mice. *J Hered.* **76**, 59-60.

Baron R, Neff L, Brown W, Courtoy PJ, Louvard D, Farquhar MG. (1988). Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway. *J Cell Biol.* **106**, 1863-1872.

Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*. **79**, 1277-1285.

Bawden CS, Sivaprasad AV, Verma PJ, Walker SK, Rogers GE.(1995). Expression of bacterial cysteine biosynthesis genes in transgenic mice and sheep: toward a new in vivo amino acid biosynthesis pathway and improved wool growth. *Transgenic Res.*, **4**, 87-104

Beedles KE, Sharpe PT, Wagner EF, Grigoriadis AE. (1999). A putative role for c-Fos in the pathophysiology of Paget's disease. *J Bone Miner Res.* **Sup2**, 21-28.

Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum SL. (1986). Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol.* **102**, 1164-1172.

Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* **245**, 855-857.

Blair HC, Teitelbaum SL, Tan HL, Koziol CM, Schlesinger PH. (1991) Passive chloride permeability charge coupled to H(+)-ATPase of avian osteoclast ruffled membrane. *Am J Physiol.*, **260**, C1315-1324.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* **423**, 337-342.

Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* **71**, 1195-1204.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. (1999) The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* **145**, 527-538.

Cadigan KM, Nusse R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286-32305.

Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* **335**, 88-99

Chatterjee D, Chakraborty M, Leit M, Neff L, Jamsa-Kellokumpu S, Fuchs R, Baron R. (1992). Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits A and B distinguish the osteoclast proton pump from other vacuolar H⁺ ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 6257-6261.

Chatterjee D, Neff L, Chakraborty M, Fabricant C, Baron R. (1993). Sensitivity to nitrate and other oxyanions further distinguishes the vanadate-sensitive osteoclast proton pump from other vacuolar H(+)-ATPases. *Biochemistry.* **32**, 2808-2812.

Chalhoub N, Benachenhou N, Vacher J. (2001). Physical and transcriptional map of the mouse Chromosome 10 proximal region syntenic to human 6q16-q21. *Mamm Genome.* **12**, 887-892.

Chalhoub N, Benachenhon N, Rajapurohitam V, Pata M, Ferron M, Frattini A, Villa A, Vacher J. (2003). Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med.* **9**, 399-406.

Chellaiah M, Kizer N, Silva M, Alvarez U, Kwiatkowski D, Hruska KA. (2000). Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J Cell Biol.* **148**, 665-678.

Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE, Moreau-Gachelin F, Tenen DG. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene.* **11**, 1549-1560.

Chen H, Zhang P, Radomska HS, Hetherington CJ, Zhang DE, Tenen DG. (1996). Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *J Biol Chem.* **271**, 15743-15752.

Christenson RH. (1997). Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem.* **30**, 573-593.

Copeland NG, Gilbert DJ, Cho BC, Donovan PJ, Jenkins NA, Cosman D, Anderson D, Lyman SD, Williams DE. (1990). Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell.* **63**, 175-183.

Currey JD. (2003) The many adaptations of bone. *J Biomech.* **36**, 1487-1495.

Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, *Blood.* **99**, 111-120.

Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, Rowe DW, Lichtler AC. (1999). Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol.* **209**, 298-307.

Dorsky RI, Moon RT, Raible DW. (2000). Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. *Bioessays.* **22**, 708-716.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. (2000a). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* **100**, 197-207

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. (2000b). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**, 1501-1504.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. **89**, 747-754.

Duhl DM, Vrieling H, Miller KA, Wolff GL, Barsh GS. (1994). Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat Genet*. **8**, 59-65.

Duong LT, Lakkakorpi PT, Nakamura I, Machwate M, Nagy RM, Rodan GA. (1998). *PYK2* in osteoclasts is an adhesion kinase, localized in the sealing zone, activated by ligation of $\alpha(v)\beta3$ integrin, and phosphorylated by src kinase. *J Clin Invest*. **102**, 881-892

Duong LT, Rodan GA. (1998). Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front Biosci*. **3**, 757-768.

Dupin E, Le Douarin NM. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* **22**, 3016-3023.

Engleman VW, Nickols GA, Ross FP, Horton MA, Griggs DW, Settle SL, Ruminski PG, Teitelbaum SL. (1997). A peptidomimetic antagonist of the $\alpha(v)\beta3$ integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J Clin Invest*. **99**, 2284-2292.

Erickson CA, Weston JA. (1983). An analysis of neural crest migration in the mouse. *J Embryol Exp Morphol*. **74**, 97-118.

Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U. (1997) Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev*. **11**, 3482-3496.

Fuchs E, Raghavan S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*. **3**, 199-209.

Furumura M, Sakai C, Potterf SB, Vieira WD, Barsh GS, Hearing VJ. (1998). Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 7374-7378.

Graham A. (2003). The neural crest. *Curr Biol*. **13**, 381-384.

Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell*. **55**, 1851-92.

Goltzman D. (2002). Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov*. **1**, 784-796.

Gong S, Yang XW, Li C, Heintz N. (2002). Highly efficient modification of bacterial artificial chromosomes (BACs) using novel shuttle vectors containing the R6Kgamma origin of replication. *Genome Res.* **12**, 1992-1998.

Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, Bertoncello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I. (1999). Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res.* **14**, 1654-1663.

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, **266**, 443-448.

Grüneberg, H. (1935). A new sub-lethal colour mutation in the house mouse. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)*, **118**, 321-342.

Grüneberg, H. (1936). Grey-lethal, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.*, **27**, 105-109.

Grüneberg, H. (1938). Some new data on the grey-lethal mouse. *J Genet.*, **36**, 153-170.

Guisse TA, Mundy GR. (1998). Cancer and bone. *Endocr Rev.*, **19**, 18-54.

Guyonneau L, Murisier F, Rossier A, Moulin A, Beermann F. (2004). Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol.* **24**, 3396-3403.

Harada S, Rodan GA. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. **423**, 349-355.

Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. (1996). Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*. **122**, 3151-3162.

Heinegard D, Oldberg A. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.*, **3**, 2042-2051.

Hearing VJ, Phillips P, Lutzner MA. (1973). The fine structure of melanogenesis in coat color mutants of the mouse. *J Ultrastruct Res.* **43**, 88-106.

Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, **74**, 395-404.

Hogan BL. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* **10**, 1580-1594.

Hollinshead MB, Schneider LC, Smith ME. (1975). Prenatal development of the grey lethal mouse. I. Teeth and jaws. *Anat Rec* **182**, 305-319.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*. **79**, 1267-1276.

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 3540-3545.

Hu PY, Roth DE, Skaggs LA, Venta PJ, Tashian RE, Guibaud P, Sly WS. (1992). A splice junction mutation in intron 2 of the carbonic anhydrase II gene of osteopetrosis patients from Arabic countries. *Hum Mutat.* **1**, 288-292

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med.* **2**, 1132-1136.

Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T. (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem.* **277**, 41147-41156.

Jackson IJ, Bennett DC. (1990). Identification of the albino mutation of mouse tyrosinase by analysis of an in vitro revertant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 7010-7014.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. (1999). Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* **104**, 439-446.

Jimbow K, Park JS, Kato F, Hirosaki K, Toyofuku K, Hua C, Yamashita T. (2000). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res.* **13**, 222-229.

Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi A. (2004). Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone.* **34**, 993-1003.

Karaplis AC, Goltzman D. (2000). PTH and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord.* **1**, 331-341.

Karsenty G, Wagner EF. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* **2**, 389-406

Karsenty G. (1999). The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* **13**, 3037-3051.

Karsenty G.(1998). Genetics of skeletogenesis. *Dev Genet.* **22**, 301-313.

Kassem M, Mosekilde L, Rungby J, Mosekilde L, Melsen F, Eriksen EF. (1991). Formation of osteoclasts and osteoblast-like cells in long-term human bone marrow cultures. *APMIS*, **99**, 262-268.

Katagiri T, Takahashi N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* **8**, 147-159.

Kawaguchi N, Ono T, Mochii M, Noda M. 2001 Spontaneous mutation in Mitf gene causes osteopetrosis in silver homozygote quail. *Dev Dyn.* **220**, 133-140.

Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC Jr, Choi Y. (2000).Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 10905-10910.

Kluppel M, Beermann F, Ruppert S, Schmid E, Hummler E, Schutz G.(1991). The mouse tyrosinase promoter is sufficient for expression in melanocytes and in the pigmented epithelium of the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 3777-3781.

Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ. (1995). Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J Cell Sci.* **108**, 2301-2309.

Kodama H, Yamasaki A, Nose M, Niida S, Ohgame Y, Abe M, Kumegawa M, Suda T. (1991). Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* **173**, 269-272.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM.(1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* **397**, 315-323.

Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. (2001). Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell.* **104**, 205-215.

Lagasse E, Weissman IL. (1997). Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell.* **89**, 1021-1031.

Lakkakorpi PT, Helfrich MH, Horton MA, Vaananen HK. (1993). Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, alpha v beta 3, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* **104**, 663-670.

Larue L, Kumasaka M, Goding CR. (2003). Beta-catenin in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Res.* **16**, 312-317.

Le Douarin NM, Dupin E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev.* **13**, 529-536.

Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun.* **309**, 689-694.

Lenhard S, Popoff SN, Marks SC Jr. (1990). Defective osteoclast differentiation and function in the osteopetrotic (os) rabbit. *Am J Anat.* **188**, 438-444.

Lerner UH. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* **19**, 107-120.

Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1566-1571.

Li Y, Okuno Y, Zhang P, Radomska HS, Chen H, Iwasaki H, Akashi K, Klemsz MJ, McKercher SR, Maki RA, Tenen DG. (2001). Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood*. **98**, 2958-2965

Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. (1999). Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet*. **23**, 447-451.

Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev*. **13**, 1015-1024.

Lowe C, Yoneda T, Boyce BF, Chen H, Mundy GR, Soriano P (1993). Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4485-4489.

Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. **371**, 799-802.

Mackie EJ, Ramsey S. (1996). Modulation of osteoblast behaviour by tenascin. *J Cell Sci*. **109**, 597-604.

Mackie EJ. (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture, *Int J Biochem Cell Biol*. **35**, 1301-1305.

Marks SC Jr, Seifert MF, McGuire JL. (1984). Congenitally osteopetrotic (op/op) mice are not cured by transplants of spleen or bone marrow cells from normal littermates. *Metab Bone Dis Relat Res*. **5**, 183-186.

Marks SC Jr. (1973). Pathogenesis of osteopetrosis in the ia rat: reduced bone resorption due to reduced osteoclast function. *Am J Anat*. **138**, 165-189.

Marks SC Jr. (1977). Osteopetrosis in the toothless (t1) rat: presence of osteoclasts but failure to respond to parathyroid extract or to be cured by infusion of spleen or bone marrow cells from normal littermates. *Am J Anat.* **149**, 289-297

Marks SC Jr. (1982). Morphological evidence of reduced bone resorption in osteopetrotic (op) mice. *Am J Anat.* **163**, 157-167.

Mayer TC. (1973). The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol.* **34**, 39-46.

McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest.* **105**, 433-440.

Miller MW, Duhl DM, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, Barsh GS. (1993). Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev.* **7**, 454-467.

Minkin C. (1982). Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* **34**, 285-290

Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, Takagi C, Miyado K, Sakai M, Ueno N, Shibuya H. (1999). A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol.* **208**, 123-133.

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell.* **89**, 773-779.

Myint YY, Miyakawa K, Naito M, Shultz LD, Oike Y, Yamamura K, Takahashi K. (1999). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation. *Am J Pathol.* **154**, 553-566

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* **108**, 17-29.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* **275**, 768-775.

Nesbitt SA, Horton MA. (1997). Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science.* **276**, 266-269.

Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa S, Kodama H. (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med.* **190**, 293-298.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* **89**, 765-771.

Packer SO. (1967). The eye and skeletal effects of two mutant alleles at the microphthalmia locus of *Mus musculus*. *J Exp Zool* **165**, 21-45.

Palokangas H, Mulari M, Vaananen HK. (1997). Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J Cell Sci.* **110**, 1767-1780.

Patapoutian A, Reichardt LF. (2000). Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol.* **10**, 392-399.

Porter SD, Hu J, Gilks CB. (1999). Distal upstream tyrosinase S/MAR-containing sequence has regulatory properties specific to subsets of melanocytes *Dev Genet.* **25**, 40-48.

Porter SD, Meyer CJ. (1994). A distal tyrosinase upstream element stimulates gene expression in neural-crest-derived melanocytes of transgenic mice: position-independent and mosaic expression. *Development.* **120**, 2103-2111.

Quarello P, Forni M, Barberis L, Defilippi C, Campagnoli MF, Silvestro L, Frattini A, Chalhoub N, Vacher J, Ramenghi U. (2004). Severe malignant osteopetrosis caused by a *GL* gene mutation. *J Bone Miner Res.* **19**, 1194-1199

Rajapurohitam V, Chalhoub N, Benachenhon N, Neff L, Baron R, Vacher J. (2001). The mouse osteopetrotic grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function. *Bone.* **28**, 513-523.

Ramirez A, Faupel J, Goebel I, Stiller A, Beyer S, Stockle C, Hasan C, Bode U, Kornak U, Kubisch C. (2004). Identification of a novel mutation in the coding region of the grey-lethal gene *OSTM1* in human malignant infantile osteopetrosis *Hum Mutat.* **23**, 471-476.

Ramirez-Solis R, Resendez-Perez D, Alvidrez-Quihui LE, Rincon-Limas DE, Varela-Martinez R, Martinez-Rodriguez HG, Barrera-Saldana HA.(1990). New vectors for the efficient expression of mammalian genes in cultured cells. *Gene.* **87**, 291-294

Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol.* **152**, 809-824.

Ravesloot JH, Eisen T, Baron R, Boron WF. (1995). Role of Na-H exchangers and vacuolar H⁺ pumps in intracellular pH regulation in neonatal rat osteoclasts. *J Gen Physiol.*, **105**, 177-208.

Reddy SV, Hundley JE, Windle JJ, Alcantara O, Linn R, Leach RJ, Boldt DH, Roodman GD.(1995). Characterization of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) gene promoter. *J Bone Miner Res* **10**, 601-606.

Reddy SV, Scarcez T, Windle JJ, Leach RJ, Hundley JE, Chirgwin JM, Chou JY, Roodman GD.(1993). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase gene. *J Bone Miner Res.* **8**, 1263-1270.

Reid K, Turnley AM, Maxwell GD, Kurihara Y, Kurihara H, Bartlett PF, Murphy M. (1996). Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* **122**, 3911-3919.

Reinholt, F. P.; Hultenby, K.; Oldberg, A.; Heinegard, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **87**, 4473-4475.

Rijkers T, Peetz A, Ruther U.(1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice..*Transgenic Res.* **3**, 203-215.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 13453-13458.

Sanjay A, Houghton A, Neff L, DiDomenico E, Bardelay C, Antoine E, Levy J, Gailit J, Bowtell D, Horne WC, Baron R. (2001). Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, $\alpha(v)\beta(3)$ integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol* **152**, 181-195.

Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. (1999). Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res*. **17**, 269-278.

Schwartzberg PL, Xing L, Hoffmann O, Lowell CA, Garrett L, Boyce BF, Varmus HE. (1997). Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in src^{-/-} mutant mice. *Genes Dev*. **11**, 2835-2844.

Scimeca JC, Franchi A, Trojani C, Parrinello H, Grosgeorge J, Robert C, Jaillon O, Poirier C, Gaudray P, Carle GF. (2000). The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone*, **26**, 207-213.

Seifert MF, Marks SC Jr. (1985). Morphological evidence of reduced bone resorption in the osteosclerotic (oc) mouse. *Am J Anat*. **172**, 141-153.

Seifert MF, Marks SC Jr. (1987). Congenitally osteosclerotic (oc/oc) mice are resistant to cure by transplantation of bone marrow or spleen cells from normal littermates. *Tissue Cell*. **19**, 29-37.

Seiji M, Fitzpatrick TB, Simpson RT, Birbeck MS. (1963). Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature*. **197**, 1082-1084.

Servet-Delprat C, Arnaud S, Jurdic P, Nataf S, Grasset MF, Soulas C, Domenget C, Destaing O, Rivollier A, Perret M, Dumontel C, Hanau D, Gilmore GL, Belin MF, Rabourdin-Combe C, Mouchiroud G. (2002). Flt3⁺ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC Immunol*. **3**, 15-26.

Severson AR. (1983). Differentiation of mononuclear cells into multinucleated osteoclast-like cells. *Exp Cell Biol*. **51**, 267-274.

Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M.-S., Luthy, R.; Nguyen, H. Q., Wooden, S.; Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319.

Smart JL, Low MJ. (2003). Lack of proopiomelanocortin peptides results in obesity and defective adrenal function but normal melanocyte pigmentation in the murine C57BL/6 genetic background. *Ann N Y Acad Sci.* **994**, 202-210.

Sobacchi C, Frattini A, Orchard P, Porras O, Tezcan I, Andolina M, Babul-Hirji R, Baric I, Canham N, Chitayat D, Dupuis-Girod S, Ellis I, Etzioni A, Fasth A, Fisher A, Gerritsen B, Gulino V, Horwitz E, Klamroth V, Lanino E, Mirolo M, Musio A, Matthijs G, Nonomaya S, Notarangelo LD, Ochs HD, Superti Furga A, Valiaho J, van Hove JL, Vihinen M, Vujic D, Vezzoni P, Villa A. (2001). The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet.* **10**, 1767-1773.

Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* **64**, 693-702.

Strewler GJ. (2001). Local and systemic control of the osteoblast. *J Clin Invest.* **107**, 271-272.

Suter A, Everts V, Boyde A, Jones SJ, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, Hayman AR, Cox TM, Evans MJ, Meister T, von Figura K, Saftig P. (2001). Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. *Development.* **128**, 4899-4910.

Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T. (1988). Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology.* **122**, 1373-1382.

Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T. (1988). Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, **122**, 1373-82.

Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. (1988) Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.*, **234**, 250-254.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* **3**, 889-901.

- Takeda K, Yasumoto K, Takada R, Takada S, Watanabe K, Udono T, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. (2000). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem.* **275**, 14013-14016.
- Teitelbaum SL. (1993). Bone remodeling and the osteoclast. *J Bone Miner Res*, **8**, S523-S525.
- Teitelbaum SL. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*. **289**, 1504-1508.
- Termine, J. D.; Kleinman, H. K.; Whitson, S. W.; Conn, K. M.; McGarvey, M. L.; Martin, G. R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, **26**, 99-105.
- Teti A, Blair HC, Teitelbaum SL, Kahn AJ, Koziol C, Konsek J, Zamboni-Zallone A, Schlesinger PH. (1989). Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts. *J Clin Invest.* **83**, 227-233.
- Thesingh CW, Scherft JP. (1985) Fusion disability of embryonic osteoclast precursor cells and macrophages in the microphthalmic osteopetrotic mouse. *Bone*. **6**, 43-52.
- Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. (2000). The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem.*, **275**, 25163-25172.
- Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*. **386**, 81-84.
- Trudel M, Lanoix J, Barisoni L, Blouin MJ, Desforges M, L'Italien C, D'Agati V. (1997). C-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is Bcl-2 and p53 independent. *J Exp Med*. **186**, 1873-1884.
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. (2002). Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem*. **50**, 125-133.
- Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, Suda T. (2000). Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab*. **18**, 177-184.

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. (1990). Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7260-7264.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. **25**, 517-523.

Vaananen HK, Horton M. (1995). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci*. **108**, 2729-2732.

Vacher J, Tilghman SM. (1990). Dominant negative regulation of the mouse alpha-fetoprotein gene in adult liver. *Science*. **250**, 1732-1735.

Vacher J, Bernard H. (1999). Genetic localization and transmission of the mouse osteopetrotic grey-lethal mutation. *Mamm Genome*. **10**, 239-243.

van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. (2001) Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, **11**, 199-226.

Walker DG.(1975). Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science*. **190**, 784-785.

Wang Q, Xie Y, Du QS, Wu XJ, Feng X, Mei L, McDonald JM, Xiong WC. (2003). Regulation of the formation of osteoclastic actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin. *J Cell Biol*. **160**, 565-575.

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*. **272**, 25190-25194.

Wozney JM. (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.*, **32**, 160-167.

Yagi K, Tsuji K, Nifuji A, Shinomiya K, Nakashima K, DeCrombrughe B, Noda M. (2003). Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. *J Cell Biochem*. **88**, 1077-1083.

Yamane T, Hayashi S, Kunisada T. (2002). Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development. *Methods Mol Biol.* **185**, 261-268.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 3597-3602.

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* **345**, 442-444.

Yoshida H, Kunisada T, Kusakabe M, Nishikawa S, Nishikawa SI. (1996). Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development.* **122**, 1207-1214.

Zhao H, Ettala O, Vaananen HK. (2002). Intracellular membrane trafficking pathways in bone-resorbing osteoclasts revealed by cloning and subcellular localization studies of small GTP-binding rab proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1060-5.

Zhao H, Laitala-Leinonen T, Parikka V, Vaananen HK. (2001). Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption. *J Biol Chem.* **276**, 39295-39302.

Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell.* **63**, 213-224.

APPENDICE I

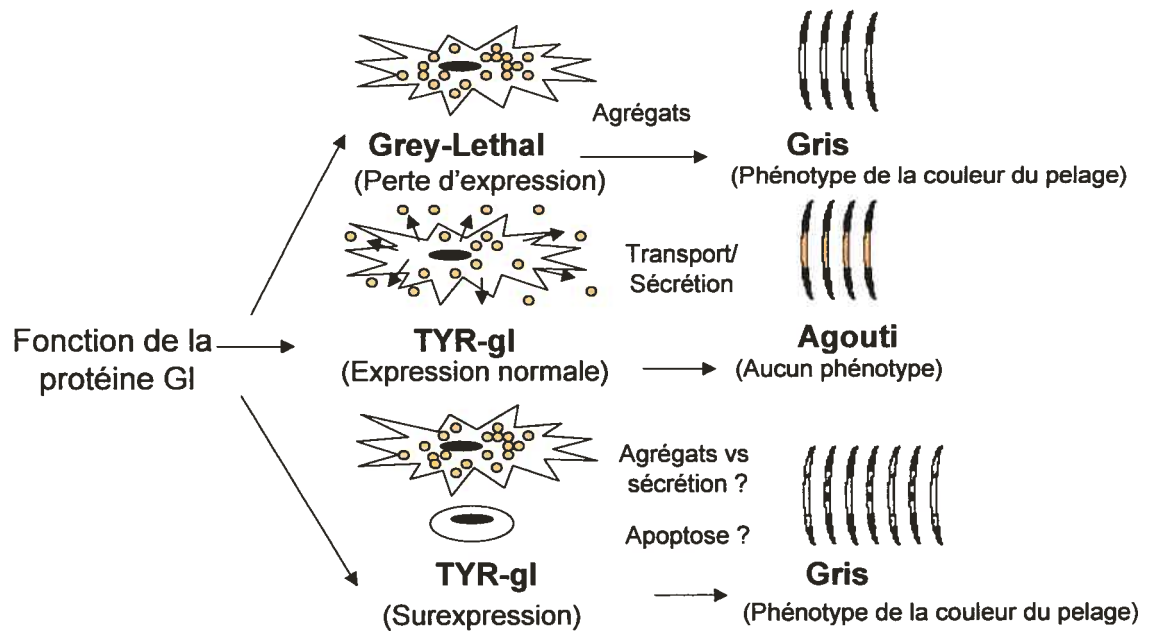


Figure 1 : Modèle proposé pour la fonction de la protéine Gl dans le transport/sécrétion des phéomélanosomes au niveau des mélanocytes.

APPENDICE II

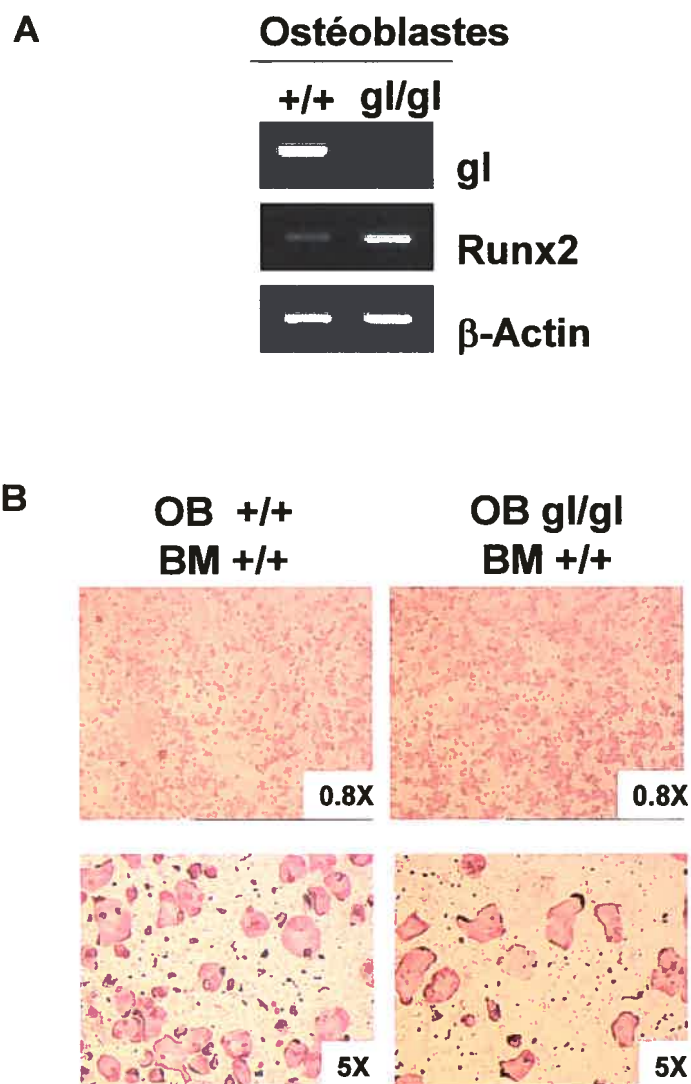


Figure 1 : A) Expression du gène *gl* dans les ostéoblastes primaires de souris sauvages et de souris *gl/gl*.
 B) Coloration TRAP (rouge) des OCLs obtenus par des essais de différenciation *in vitro* de cellules de la moelle osseuse sauvage (BM+/+) avec des ostéoblastes sauvages (OB +/+) ou des ostéoblastes *gl* (OB *gl/gl*)

APPENDICE III

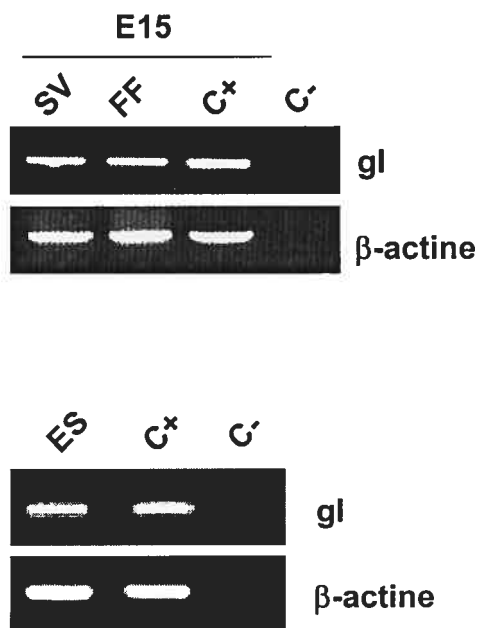


Figure 1 : A) Expression du gène *gl* dans le sac vitellin (SV) et le foie fœtal (FF) d'une souris sauvage.
B) Expression du gène *gl* dans les cellules souches embryonnaires sauvages dérivées de la souris 129Sv.

APPENDICE IV

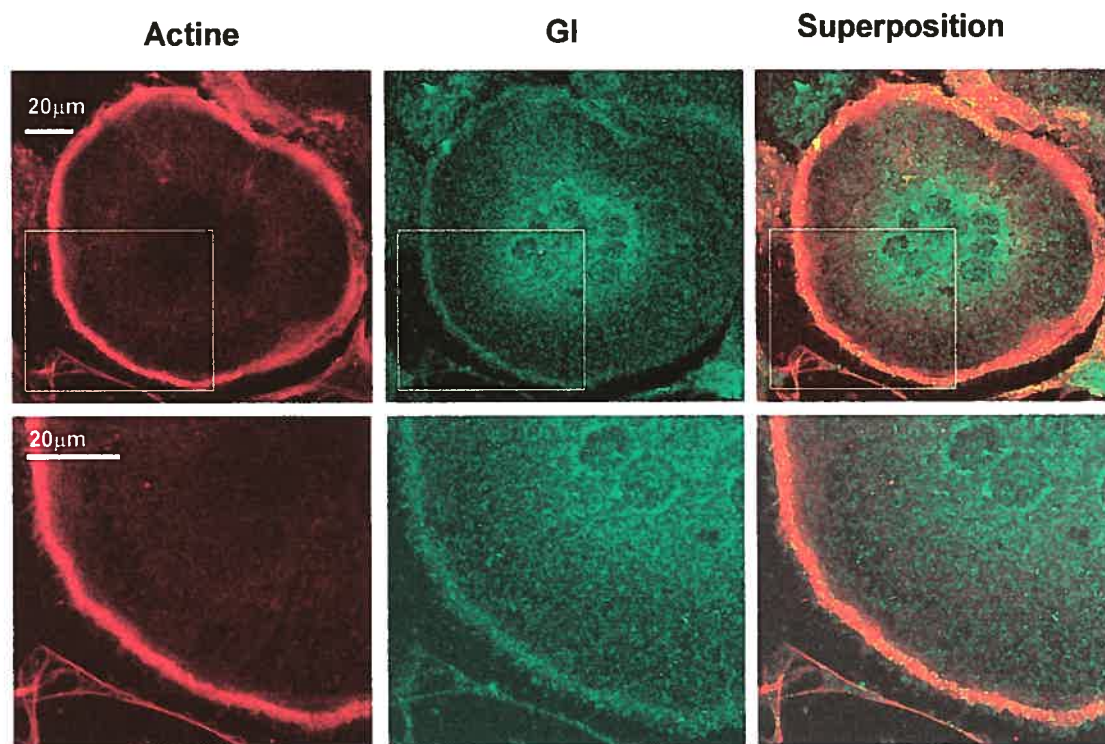


Figure 1 : Localisation de la protéine Gl (vert) par immunofluorescence sur des ostéoclastes primaires isolés d'une souris sauvage. L'actine est détectée par une coloration phycoérythrine (rouge) et est principalement localisée à la périphérie de la cellule (anneau d'actine).

APPENDICE V

A) Criblage d'une banque de BAC

Des essais PCR différents, utilisant des paires amorces localisées à -14 Kb en amont du gène PU.1 et dans le deuxième intron du gène PU.1, ont été utilisés pour cribler une banque de chromosomes artificiels de bactéries (BACs). Parmi les clones obtenus, un BAC de 105 Kb contient la totalité du gène PU.1 incluant plus de 30 Kb de séquences régulatrices en amont du site d'initiation de la transcription et 18 Kb de séquences en aval du site de polyadénylation du gène PU.1 (APPENDICE V, Figure 1A). Ce clone a été choisi pour générer le transgène PU.1-gl en remplaçant, par une technique de recombinaison homologue (Gong S. *et al.* 2002), la séquence génomique du gène PU.1 par la séquence codante du gène *gl*.

B) Délétion du gène Tbp1

Une analyse plus détaillée du BAC choisi a révélé la présence du gène Tbp1 en 5' du gène PU.1 (APPENDICE V, Figure 1A). Afin d'éliminer les effets qu'entraînerait l'expression du gène Tbp1 sur le transgène, ce dernier a été éliminé du BAC par une première étape de recombinaison homologue dans les bactéries. Un vecteur de recombinaison contenant deux séquences d'homologie encadrant le gène Tbp1 a été préparé (APPENDICE V, Figure 1B). Ce vecteur contient également deux marqueurs de sélection facilitant les étapes de criblage des clones recombinants (Gong S. *et al.* 2002). Cette technique a ainsi permis d'éliminer la totalité du gène Tbp1 et de générer un nouveau BAC PU.1 utilisé pour les étapes subséquentes de la préparation du transgène PU.1-gl (APPENDICE V, Figure 1C).

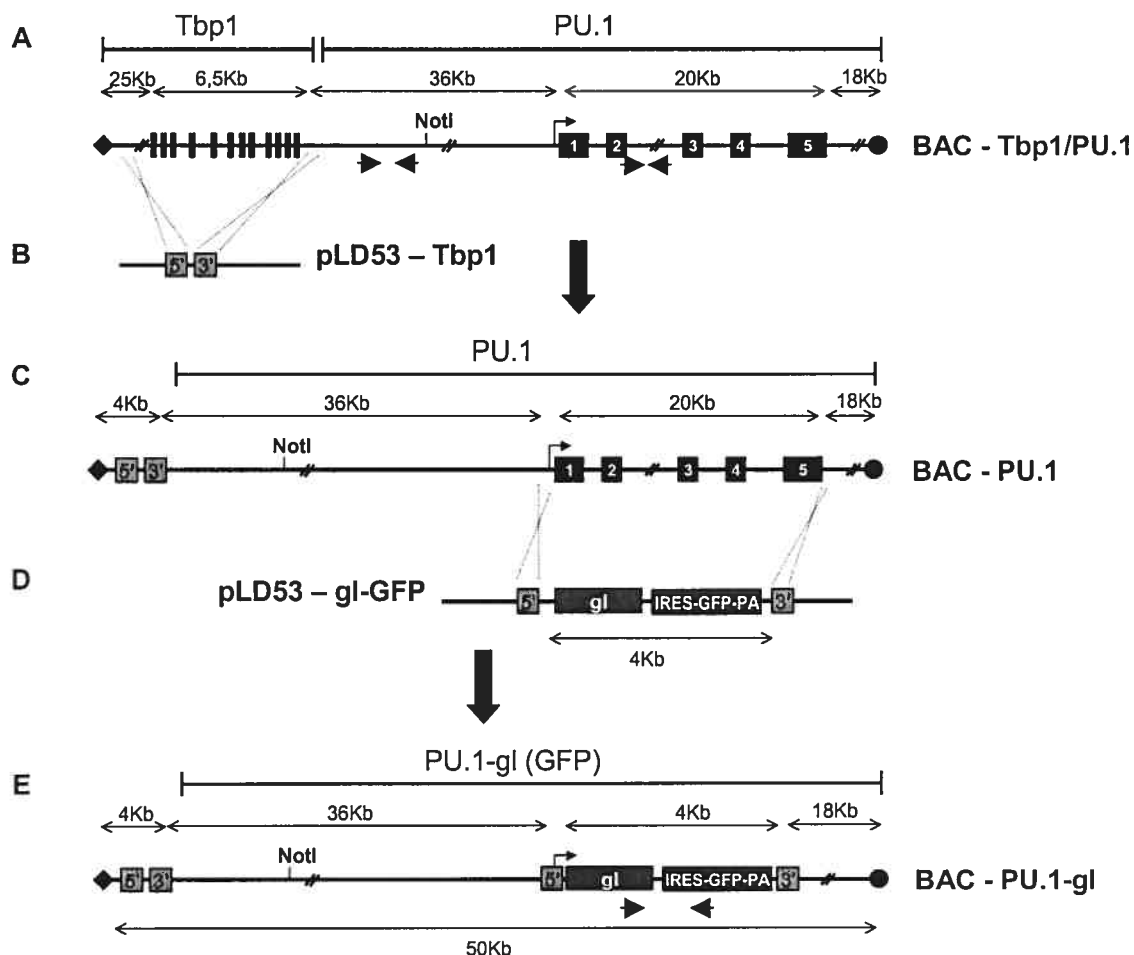


Figure 1 : Préparation par recombinaison homologue du transgène PU.1-*gl*

- Représentation du BAC initial contenant le gène *Tbp1* et *PU.1*.
- Vecteur de recombinaison utilisé pour enlever le gène *Tbp1* : 5', séquence d'homologie localisée en 5' de la séquence promotrice du gène *Tbp1*; 3', séquence d'homologie localisée en 3' de la séquence du gène *Tbp1*.
- Représentation du BAC après la délétion du gène *Tbp1*.
- Vecteur de recombinaison utilisé pour insérer le gène *gl* sous le contrôle du promoteur *PU.1* : 5', séquence d'homologie localisée en 5' de la séquence codante du gène *PU.1*; *gl*, séquence codante du gène *gl*; IRES-GFP-PA, site interne d'initiation de la traduction ainsi que la séquence codant pour la protéine GFP et un signal de polyadénylation du gène PGK (phosphoglycérate kinase); 3', séquence d'homologie localisée en 3' de la séquence du gène *PU.1*.
- Représentation du BAC *PU.1-gl*.

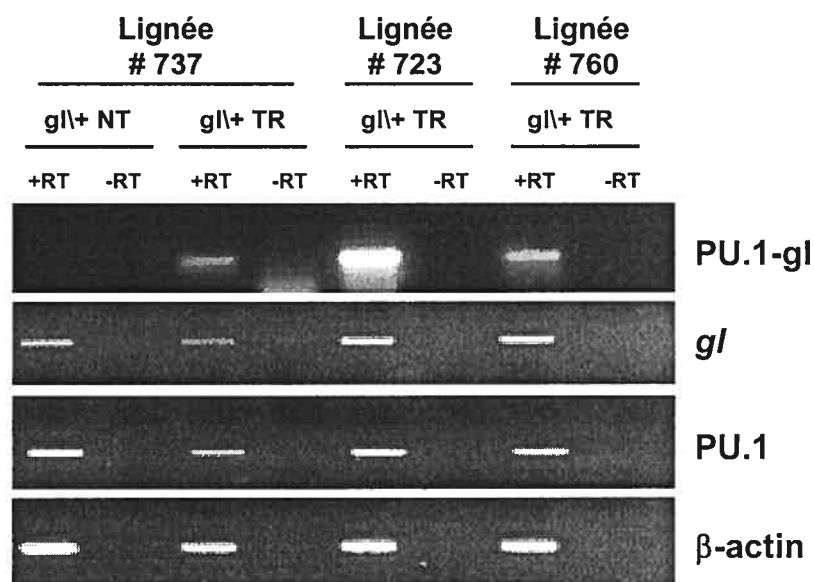


Figure 2: Analyse d'expression du transgène PU.1-gl

RT-PCR avec des ARN isolés de rate de souris (F_2) *gl*/+ transgéniques (TR) et non transgéniques (NT) de trois lignées PU.1-gl. La spécificité du produit d'amplification PU.1-gl (amorces représentées sur APPENDICE V Figure 1E) a été révélée par hybridation avec une sonde radioactive correspondant à l'exon 5-6 du gène *gl*. Le niveau endogène d'expression des gènes PU.1 et *gl* a aussi été vérifié et reste inchangé dans les transgéniques PU.1-gl.

C) Substitution du gène PU.1 par la séquence codante du gène *gl*

La séquence exonique et intronique du gène PU.1 a été substituée par la séquence codante du gène *gl* par recombinaison homologue dans les bactéries. Un vecteur de recombinaison contenant deux séquences d'homologie encadrant le gène PU.1 a été préparé. Le cDNA de *gl* a été inséré à l'intérieur de ces deux boîtes d'homologie. De plus, une cassette IRES-GFP-PA contenant un site interne d'initiation de la traduction ainsi que la séquence codant pour la protéine GFP et un signal de polyadénylation du gène PGK (phosphoglycérate kinase) ont également été ajoutés au vecteur de recombinaison (APPENDICE V, Figure 1D). Ainsi, la production de la protéine GFP permettra de suivre l'expression du transgène chez les souris PU.1-*gl*.

D) Génération de lignées transgéniques PU.1-*gl*

Le BAC PU.1-*gl* ainsi généré (APPENDICE V, Figure 1E) a été microinjecté afin de générer des souris transgéniques PU.1-*gl*. Cinq lignées transgéniques ont été générées et croisées avec des souris hétérozygotes *gl*/+. Des souris F₁ transgéniques hétérozygotes *gl*/+ ont à nouveau été croisées avec des souris hétérozygotes *gl*/+ afin de générer des souris homozygotes *gl*/*gl* transgéniques qui ont été analysées pour la complémentation du phénotype ostéopétrotique (APPENDICE V, Figure 3)

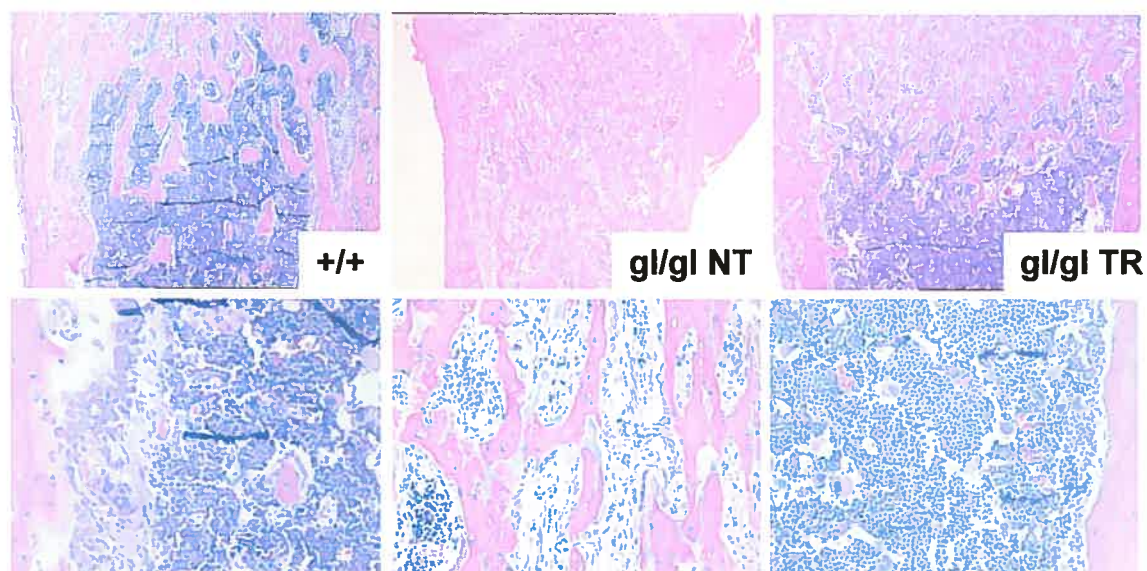


Figure 3 : Complémentation du phénotype ostéopétrotique dans les souris transgéniques PU.1-gl

Coloration hématoxyline/éosine de coupes de fémurs isolés des souris PU.1-gl : +/+ non transgénique contrôle, *gl/gl* transgénique (TR) et *gl/gl* non transgénique (NT). Microscopie optique au niveau de l'épiphyse (5X) (haut) et au niveau de la diaphyse (20X) (bas).

